ISOLIERUNG UND EIGENSCHAFTEN EINER LIPASE AUS DEM SKELETTMUSKEL DER RATTE

Renate Pusch-Beier

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0023

ISOLIERUNG UND EIGENSCHAFTEN EINER LIPASE AUS DEM SKELETTMUSKEL DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Renate Pusch-Beier

München 1978

1. Berichterstatter: Prof. Dr. O.H. Wieland
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 6.2.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Für OEPENs

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1974 bis März 1978 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. O.H. Wieland am Institut für Diabetesforschung in München ausgeführt.

Herrn Professor Dr. O.H. Wieland danke ich sehr herzlich für sein ausdauerndes Interesse an dieser Arbeit, für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen.

Herrn Professor Dr. G. Löffler und Herrn Dr. E.A. Siess gilt mein Dank für hilfreiche und anregende Kritik.

Fräulein G. Stejskal möchte ich für geschickte und zuverlässige Mitarbeit während eines Jahres danken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Diabetesforschung bedanke ich mich für Hilfsbereitschaft und Diskussion, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
A.	E I N L E I T U N G	1
B.	M E T H O D E N	9
1.	Verwendete Reagenzien, Geräte und Versuchstiere	9
1.1.	Reagenzien	9
1.2.	Geräte	11
1.3.	Versuchstiere	11
2.	Bestimmung der Lipaseaktivität mit Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat als Substrat	12
2.1.	Prinzip	12
2.2.	Testbedingungen	12
2.2.1.	Testreagenzien	12
2.2.1.1.	Substrat: Trioleinemulsion mit Glyceryl tri (1-^{14}C)oleat	12
2.2.1.2.	Muskel 14 000 g Überstand	12
2.2.2.	Inkubationsansatz und dessen Aufarbeitung	12
2.3.	Prüfung des Tests	13
3.	Bestimmung der Lipaseaktivität mit (2-^{3}H) Glyceryl trioleat als Substrat	17
3.1.	Prinzip	17
3.2.	Testbedingungen	17
3.3.	Prüfung des Tests	17
4.	Bestimmung der Lipoproteinlipaseaktivität	18
4.1.	Prinzip	18
4.2.	Testbedingungen	18
4.2.1.	Gewinnung von Postheparinplasma der Ratte	18
4.2.2.	Inkubationsansatz und dessen Aufarbeitung	18
4.3.	Prüfung des Tests	19

Seite

5. Berechnung der lipolytischen Aktivität 20
5.1. Für Lipase mit Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat als Substrat und Lipoproteinlipase 20
5.2. Für Lipase mit (2-^{3}H)Glyceryl trioleat als Substrat 21

6. Proteinbestimmung 21
6.1. Modifizierte Biuret-Methode zur Entfernung von Lipid-Trübungen 21
6.2. Modifizierte Lowry-Methode 21

7. Triton X-100-Bestimmung 22

8. Entfernung von Triton X-100 aus Lipaselösungen 23

9. Bestimmung der Cholesteryloleat-Hydrolase-Aktivität 23

10. Bestimmung der Oleoyl-CoA- und Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität 24
10.1. Prinzip 24
10.2. Testbedingungen 24

11. Herstellung der Gele für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese 24
11.1. Gele ohne Triton X-100 24
11.2. Triton X-100-haltige Gele 25
11.3. Triolein- und Triton X-100-haltige Gele zum Lipasenachweis im Gel 25

12. Untersuchungen zur Regulation der Muskellipase 26
12.1. Ganztierversuche 26
12.1.1. Verschiedene Fütterungsbedingungen 26
12.1.2. Alloxandiabetische Tiere 26
12.1.3. Isoproterenol-Stimulierung 26
12.1.4. Entnahme und Aufarbeitung der Muskelproben für die Lipasebestimmung 27

Seite

12.2. In vitro Versuche mit Rattenzwerchfell 27
12.3. Versuche zur Aktivierung von Muskellipase durch ATP-abhängige Phosphorylierung 27
12.3.1. Versuche mit 100 000 g Überstand ohne Zusatz von Proteinkinase 28
12.3.2. Aktivierungsversuche mit zugesetzter Proteinkinase aus Rinderherz- und Rattenskelettmuskel 28
12.4. Präparation von Proteinkinase aus dem Rattenhinterbeinmuskel 29
12.5. Bestimmung der Proteinkinaseaktivität 31
12.5.1. Prinzip 31
12.5.2. Testbedingungen 31
12.5.3. Prüfung des Tests 31

13. Triglyceridbestimmung 33

14. Glucosebestimmung 33

C. E R G E B N I S S E 34

I. Reinigung und Charakterisierung einer Lipase aus dem Skelettmuskel der Ratte 34

1. Vorbereitende Untersuchungen 34
1.1. Solubilisierung der Lipase 34
1.2. Lipaseaktivität in verschiedenen Spezies 35

2. Präparation einer Lipase aus dem Skelettmuskel der Ratte 36

3. Charakterisierung und Eigenschaften der Lipase 41
3.1. Testkriterien 41
3.2. Gehalt an Lipoproteinlipase 42
3.3. Stabilität der Lipase 44
3.4. Molekulargewichtsbestimmung an Sepharose 6B 47
3.5. Inhibitoren der Lipase 49

		Seite
3.6.	Wirkung von Polyaminen	54
3.7.	Ersatz von Triton X-100 im Lipasetest durch Phospholipide	55
3.8.	Substratspezifität	56
3.9.	Stöchiometrie der Lipasereaktion	57
3.10.	Spaltprodukte des Trioleins	58
3.11.	Elektrophoretische Untersuchungen der Muskellipase (Polyacrylamidgel-Elektrophorese)	58
3.11.1.	Triton X-100-haltige Gele und Gele ohne Triton X-100	58
3.11.2.	Versuch der Lokalisation der Lipase im Gel: direkter Nachweis der Lipaseaktivität im trioleinhaltigen Gel	60
II.	Untersuchungen zur Regulation der Muskellipase	62
1.	Ganztierversuche	62
1.1.	Mit verschiedenen Diäten ernährte und gehungerte Ratten	62
1.2.	Alloxandiabetische Ratten	63
1.3.	Versuche der Lipaseaktivierung durch Isoproterenol, in vivo	64
2.	In vitro Versuche	66
2.1.	Versuche am isolierten Rattendiaphragma	66
2.2.	Versuche zur Lipaseaktivierung in löslichen Systemen	68
2.2.1.	Mit endogener Proteinkinase	68
2.2.2.	Mit zugesetzter cAMP-abhängiger Proteinkinase	69
2.3.	Versuche zur Inaktivierung der Muskellipase	74
2.4.	Phosphorylierungsversuche mit γ^{32}P-ATP	75
D.	DISKUSSION	76
E.	ZUSAMMENFASSUNG	83
F.	LITERATURVERZEICHNIS	85

A B K Ü R Z U N G E N

ADP	Adenosindiphosphat
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Alu-Gel-S	Aluminiumhydroxyd C_γ Suspension
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
cAMP	3', 5' cyclo AMP
cGMP	3', 5' cyclo GMP
Ci	Curie
CoA, CoASH	Coenzym A
cpm	counts per minute
D	Dichte
dbcAMP	dibutyryl-3', 5' cyclo AMP
DE-52-Cellulose	DEAE-Cellulose (Diäthylaminoäthyl-Cellulose)
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
EGTA	Äthylenglycoltetraacetat
FFS	freigesetzte Fettsäure
GK	Glycerokinase
Gl-DH	Glucose-Dehydrogenase
Glycerin-3P	Glycerin-3-phosphat
IBMX	1-Methyl-3-Isobutyl-Xanthin
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
α-KGDH	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
mA	Milliampere
min	Minute
NAD^+	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid
NEM	N-Äthylmaleinimid
PEP	Phosphoenolpyruvat
pHMB	p-Hydroxymercuribenzoat
PK	Pyruvatkinase
POPOP	1, 4-Bis-2-(5-phenyloxazol)-benzol
PPO	2', 5'-Diphenyloxazol

s.A.	spezifische Aktivität
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
sek	Sekunde
Std(n)	Stunde(n)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin
TO	Triolein
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	unit

A. EINLEITUNG

Triglyceride werden hauptsächlich vom Fettgewebe und Muskel aus den Chylomikronen des Blutes aufgenommen, Cholesterinester zum größten Teil in der Leber verwertet (1).

Die Aufnahme der Triglyceride ist an das Vorhandensein von Lipoproteinlipasen gebunden, die im Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskel, Lunge (2) und wahrscheinlich auch in anderen Geweben vorkommen (3) und auf den Endothelzellen der gewebeversorgenden Kapillaren lokalisiert sind (3). Das endotheliale Enzym ist verantwortlich für den Triglyceridentzug aus dem Blut (4). Heparin setzt die Lipoproteinlipase aus den endothelialen Membranen der Blutkapillaren extrahepatischer Gewebe frei. Sie erscheint dann als Postheparinplasma-Lipoproteinlipase im Blut. Die Lipoproteinlipase der Gewebe wird durch den Ernährungszustand in ihrer Aktivität modifiziert (5), beim Hunger ist sie im Fettgewebe erniedrigt, im Herz- und Skelettmuskel erhöht. Insulin induziert die Lipoproteinlipase im Fettgewebe (6).

Folgender Reaktionsablauf wird für die Aufnahme der Triglyceride in die Gewebe angenommen: die Chylomikronen werden an die kapilläre Endotheloberfläche in geeigneter Entfernung zur Lipoproteinlipase angelagert und teilweise durch die Plasmamembran der Endothelzelle eingehüllt (7). Die enzymatische Hydrolyse der Triglyceride wird durch Apolipoprotein C der Chylomikronen aktiviert (der eigentliche Aktivator des Enzyms ist Apolipoprotein C-II), und zwar durch Wechselwirkung mit dem Substrat (8). Reaktionsprodukte sind Glycerin und Fettsäuren, die je nach Art des Gewebes von den Zellen aufgenommen, oder ins Blut entlassen werden. Letzteres gilt vor allem für das Glycerin, das mangels Glycerokinase im Skelettmuskel und Fettgewebe praktisch nicht verwertet werden kann (9). Nach Spaltung der Triglyceride verbleibt ein Chylomikronen-Restpartikel (1), der von der endothelialen Oberfläche ins Blut gelangt und in der Fraktion der Lipoproteine hoher Dichte (HDL) gefunden wird zusammen mit Apolipoprotein C (8), (10).

Mobilisierung der Lipiddepots im Fettgewebe

Hauptdepot für Triglyceride ist das Fettgewebe. Durch eine hormonsensitive Lipase wird die Fettmobilisierung eingeleitet. Es handelt sich um ein interkonvertierbares Enzym, das durch cAMP-abhängige Phosphorylierung aktiviert wird. Dies konnte von Corbin et al. (11) in Versuchen mit Fettgewebshomogenaten und von Huttunen et al. (12), (13) sowie Belfrage et al. (14) auch mit angereicherter Fettgewebslipase gezeigt werden. Neuerdings wurde gefunden, daß die Fettgewebslipase auch durch eine cGMP-abhängige Proteinkinase aktiviert wird (15).

Die Catecholamine sind das wichtigste Hormon für die Fettmobilisierung. Sie führen über Bindung an ß-Rezeptoren zu erhöhter Adenylatcyclase-Aktivität mit Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels und damit zur Aktivierung der Proteinkinase. Auch andere Hormone, wie Glucagon und ACTH, fördern die Fettmobilisierung, wahrscheinlich über denselben Mechanismus (16), (17). Als wichtigster Gegenspieler der genannten Hormone hemmt Insulin die Lipolyse im Fettgewebe. Es spricht vieles dafür, daß dieser Effekt des Insulins durch Senkung des cAMP-Spiegels zustande kommt (18).

Nicht nur die Triglyceridlipase, sondern auch Di- und Monoglyceridlipasen sind hormoneller Regulation unterworfen (19). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß eine Cholesterinesterhydrolase ebenfalls über das Adenylatcyclase-System aktiviert wird (20) - (22). Dieser Mechanismus scheint der stimulierenden Wirkung des ACTH auf die Steroidsynthese der Nebennierenrinde zugrunde zu liegen.

Die Proteinphosphatase des Fettgewebes, die zur Dephosphorylierung und Inaktivierung der Lipase führt, ist noch unzureichend charakterisiert. Sie scheint wenig spezifisch zu sein, da auch Proteinphosphatasen aus Herz und Leber zur Inaktivierung der Tri- (23) und Diglyceridlipase (24) befähigt sind.

Bedeutung der Lipide im Muskelstoffwechsel

Fettsäuren stellen als Energiequelle für Skelett- und Herzmus-

kel ein vorzügliches Substrat dar (25) – (27). In Ruhe oder unter mäßiger Arbeit reichen beim normal ernährten Menschen die vom Skelettmuskel aufgenommenen Fettsäuren für die Energiegewinnung aus. Zierler (28) und Havel et al. (29) sind der Ansicht, daß ein Teil der Fettsäuren direkt verbrannt wird, der Rest in intrazellulären Pools gespeichert wird. Nach Dagenais et al. (30) wandern dagegen die von der Muskelzelle aufgenommenen Fettsäuren zunächst in einen Lipidpool, aus dem sie entsprechend dem Energiebedarf wieder freigesetzt werden. Dasselbe soll für den Herzmuskel gelten (31), (32).

Unter schwerer Arbeit benötigt der Muskel zur Deckung des Energiebedarfes außer Fettsäuren auch Glucose (33). Je nach Belastung ändert sich die anteilmäßige Verwertung von Plasma-Fettsäuren, -Glucose und intrazellulären Speichern (Glycogen). Die Ketonkörper sind in ihrer Wertigkeit den Fettsäuren mindestens gleichzusetzen, wenn nicht überlegen. In vivo und in vitro Studien zeigen, daß Plasma-Fettsäuren und Ketonkörper der bevorzugte Energielieferant des Herzens sind (34), da sie die Glucoseverwertung des Herzens herabsetzen (35), (36). Gesteigerte Arbeit entweder durch Erhöhung des Aortendrucks (37) oder Erhöhung des Füllungsdrucks des linken Vorhofes gefolgt von gesteigerter ventrikulärer Druckentwicklung und Volumenarbeit (38) führen zu erhöhtem Triglyceridverbrauch und Fettsäureoxidation im isoliert perfundierten Herzen.

Über die Bedeutung intrazellulärer Triglyceridspeicher für die Substratversorgung des Herz- und Skelettmuskels gehen die Ansichten auseinander. Nach in vitro Studien am Skelettmuskel werden Fettsäuren durch Lipolyse aus intrazellulären Glyceriden für die ß-Oxidation freigesetzt (39), (40). In Perfusionsexperimenten am isolierten Herzen ohne Zusatz von Substraten wurde eine Abnahme der Herz-Triglyceride um 70 % gefunden (41). Dagegen konnten Masoro et al. (42) keine Abnahme der intrazellulären Lipidspiegel im Skelettmuskel nach schwerer Arbeit nachweisen. Eine solche findet nach in vitro Studien nur nach ausgedehntem Hunger (>72 Stdn) statt (43). Andere Daten sprechen wiederum für die Hydrolyse intrazellulärer Triglyceride auch

unter normalen Bedingungen (37), (38), (44) – (46).

Hormonelle Regulation des Lipidstoffwechsels im Herzmuskel
(Versuche am intakten Herzen)

Die Lipolyse im Herzmuskel unterliegt hormoneller Regulation. Adrenalin steigert die Glycerinfreisetzung (47) - (49) und den Triglyceridabfall im isoliert perfundierten Rattenherzen (50) - (52). Das gilt nicht für das hypoxische Herz (53). Auch Glucagon kann den Glycerinausstrom aus dem perfundierten Rattenherzen erhöhen (54). Theophyllin senkt den endogenen Triglyceridgehalt und erhöht die CO_2-Produktion aus endogenen Triglyceriden (38). Der Adrenalineffekt wird durch ß-Blocker gehemmt (55). Nach Lech et al. (56) blockiert Propranolol den lipolytischen Effekt von Isoproterenol, jedoch nicht den des Glucagons. Insulin hatte keinen Hemmeffekt auf die Glucagon- oder Isoproterenol-stimulierte Glycerinfreisetzung aus dem isoliert perfundierten Rattenherzen (54), (56). Prostaglandin E_1 senkt die Lipaseaktivität in ventrikulären Homogenaten, wobei ein Anstieg von Triglyceriden als Hemmung der Lipolyse gedeutet wurde (57). Keely et al. (58) zeigten, daß Catecholamine und Glucagon die Adenylatcyclase erhöhen, und zwar in Konzentrationen, die zur Steigerung der Lipolyse führten. Auch dbcAMP führte zu einem erhöhten Triglyceridverbrauch im perfundierten Rattenherzen (51).

Lipolytische Enzyme des Herzmuskels

Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß im Herzen eine durch Heparin freisetzbare Lipoproteinlipase aus einem Pool stammt, in dem Lipoproteinlipase nicht durch Heparin freisetzbar ist, bzw. mit einem solchen assoziiert ist. Der letztere ist nicht sofort für die Chylomikronen-Hydrolyse verfügbar (59) - (62). Björntorp et al. (63) wiesen im Rattenherzen zwei Triglyceridlipasen nach: 1. eine Lipoproteinlipase mit alkalischem p_H-Optimum, die durch Serum aktiviert und durch Protaminsulfat gehemmt wird, 2. eine Lipase mit neutralem p_H-Optimum, die Protaminsulfat-resistent ist. Sie hydrolysiert endogene Triglyceride und wurde als Gewebslipase bezeichnet. Auch Schousboe et al. (64) fanden zwei Lipasen im Rinderherzen: eine Lipoproteinlipase und eine neu-

trale Lipase.

Eine Monoglyceridlipase wurde von Yamamoto et al. (65) im Rattenherzmuskel beschrieben.

Untersuchungen zur hormonellen Kontrolle der Lipase in Herzmuskelextrakten

Adrenalin (66) und gesteigerte Arbeit (67) erhöhen die Lipaseaktivität in Herzmuskelextrakten von isoliert perfundierten Ratten- und Kaninchenherzen. Jesmok et al. (68) beschrieben eine Solubilisierung der Lipase aus Herzmuskel mit Lubrol-PX, die eine mehr als 10-fache Reinigung des Enzyms gegenüber dem 2 000 g Überstand des Homogenats erbringt. An dieser Fraktion konnte eine Aktivierung durch Adrenalin in Gegenwart von Serum und Serum plus Protaminsulfat gezeigt werden. Lech et al. (56) fanden nach in vivo Hormongabe in Herzextrakten nur geringe Hinweise, die für eine hormonsensitive Lipase sprechen. Mögliche Erklärungen dafür wären, daß die Lipase während der Extraktion aktiviert wurde, oder mit Lipoproteinlipase verunreinigt war, welche nicht auf das Hormon anspricht. Mogelnicki et al. (69) konnten zeigen, daß cAMP, ATP, Mg^{2+} und Theophyllin die Triglyceridhydrolase im 2 000 g Überstand von Herzhomogenaten stimulieren. Sie fanden weiterhin eine Steigerung der Triglycerid-Hydrolyse im 2 000 g Überstand des Herzhomogenats oder des lubrolextrahierten Enzyms durch Zusatz von Proteinkinase aus Rinderherz (70). Nach Untersuchungen verschiedener Autoren ist die Lipaseaktivität auf die lösliche, mikrosomale und mitochondriale Fraktion des Herzmuskels verteilt (63), (64), (71), (72). Adrenalin soll die Lipaseaktivität in der mikrosomalen Fraktion erhöhen (73). Nach Lech et al. (56) enthält die lösliche und die mikrosomale Fraktion sowohl Lipoproteinlipase, die durch Protaminsulfat gehemmt wird, als auch neutrale Lipase, die durch Protaminsulfat stimuliert wird. Eine Lipoproteinlipaseaktivität wurde auch in isolierten Rattenherzmyozyten nachgewiesen (74).

Versuche zur Isolierung einer Lipoproteinlipase aus Schweineherz führten zu einer etwa 70 000-fachen Anreicherung (75). Ei-

ne Lipoproteinlipase aus Rattenherz wurde von Twu et al. (76) und Chung et al. (77) bis zur chromatographischen und elektrophoretischen Reinheit gereinigt.

Einfluß veränderter Stoffwechselbedingungen auf die Lipoproteinlipase

Nach Borensztajn et al. (78) sind Rattenherzmuskel-Lipoproteinlipase, nach Weisenburg Delorme et al. (5) und Hollenberg (79) Rattenherzmuskel- und Rattenskelettmuskel-Lipoproteinlipase im Hunger erhöht. Linder et al. (80) fanden bei Hunger eine erhöhte Lipoproteinlipaseaktivität im Herzmuskel und in roten Muskeln, nicht jedoch in weißen. Glucagon soll eine Rolle in der Regulation der myocardialen Lipoproteinlipase spielen, indem es die Lipoproteinlipaseaktivität gefütterter Tiere auf Werte gehungerter Tiere steigert und bei Wiederfütterung den Abfall der Aktivität auf Normalwerte verhindert (81). Borensztajn et al. (82) beobachteten eine Steigerung der Lipoproteinlipase im Skelettmuskel auch nach Arbeit. Wie Linder et al. (80) und Tan et al. (83) fanden sie in roten Muskeln höhere Lipoproteinlipaseaktivitäten als in weißen.

Diurnale Schwankungen der Herz- und Skelettmuskel-Lipoproteinlipase wurden von Kotlar et al. (84) bei gefütterten und gehungerten normalen Ratten, bei gefütterten, jedoch nicht bei gehungerten Streptozotozin-diabetischen Ratten gefunden. Die höchsten Aktivitäten lagen während des Tages vor, bei Nacht erfolgte eine Abnahme auf Basiswerte. Die Lipoproteinlipaseaktivitäten waren nicht mit den Plasma-Glucagon-Spiegeln korreliert. Nach Bégin-Heick et al. (85) führt Kälteakklimatisation bei Ratten zu erhöhter Lipoproteinlipaseaktivität im Herzen, Diaphragma und Soleusmuskel, ein Effekt, der durch Zugabe von Oxytetracyclin während der Kältebehandlung verstärkt wird.

Lithell et al. (86) wiesen Lipoproteinlipaseaktivität in menschlichen Skelettmuskelextrakten nach.

Über lipolytische Enzyme des Skelettmuskels, die nicht der Gruppe der Lipoproteinlipasen angehören, ist nur wenig bekannt.

Wallach (87) fand vier lipolytische Aktivitäten im Rattenskelettmuskel: Monopalmitinlipase, Monomyristinlipase, Tricaproinlipase und Monolaurinlipase. Tricaproinlipase hat ein saures p_H-Optimum, die anderen alkalische p_H-Optima. Monopalmitin- und Monomyristinlipase sind partikulär, Monocaproin- und Monolaurinlipase im hochtourigen Überstand. Die Daten dieser Arbeit legen nahe, daß Monoglyceride, nicht Triglyceride, in die Muskelzelle eintreten und dort hydrolysiert werden.

Lipasen wurden auch im Brustmuskel der Taube und des Stars und in den Flugmuskeln der Motte nachgewiesen (88) - (91). Crabtree et al. (92) haben Tri-, Di- und Monoglyceridlipase im Posterior adductor von Mollusken, in Flugmuskeln von Insekten, in roten und weißen Muskeln von Fischen, im Brustmuskel von Vögeln und in roten und weißen Muskeln sowie im Herzmuskel von Säugetieren (Kaninchen, Ratte) gemessen. Das p_H-Optimum für Rattenherz- und Heuschreckenflugmuskel-Triglyceridlipase liegt bei 7,5. Die Triglyceridlipase ist keine Lipoproteinlipase, da sie nicht durch 0,8 M NaCl gehemmt wird. Die Triglyceridlipaseaktivität aus Rattenherzen und Insektenflugmuskeln wird nicht durch Inkubation mit cAMP, ATP, Mg^{2+} und Coffein beeinflußt. Allerdings bleibt unklar, ob die Lipaseaktivität im Extrakt nicht schon in der aktivierten Form vorlag. Die Mono- und Diglyceridlipaseaktivitäten waren etwa 5 bis 10-fach höher als die der Triglyceridlipase.

Kinnunen et al. (93) setzten aus der 5 000 g Pellet-Fraktion des Schweineskelettmuskels mit Heparin eine Lipase frei, wobei die Ausbeute durch Zusatz von Plasma erhöht wurde. Durch selektive Bindung an die Trioleinkomponente von Intralipid unter Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes und Heparin-Sepharose-Affinitätschromatographie wurde die Lipase auf eine spezifische Aktivität von 198 μMol FFS/mg Prot. x 60 min angereichert. Das Enzym wird durch Serum, nicht aber durch 1 M NaCl gehemmt. Diese Lipase ähnelt in ihren Eigenschaften einer Triglyceridlipase aus der Leber.

Lipasen für die Hydrolyse von Tributyrin und Tripalmitin wurden

im Skelettmuskel der Maus gefunden. Tripalmitinaseaktivität war nur nach Vorbehandlung der Muskelpräparation mit dem nichtionischen Detergenz Cutscum meßbar, bei einem p_H-Optimum von 6,5. Skelettmuskel von dystrophischen Mäusen zeigten signifikant erhöhte Aktivitäten für die kurzkettigen und langkettigen Triglyceridlipasen im Vergleich zu gesunden Kontrollen desselben Wurfs. In dieser Arbeit wird das erste Mal im Skelettmuskel eine Lipase für Triglyceride mit langkettigen Fettsäuren beschrieben. Es handelt sich um ein membrangebundenes, vermutlich mikrosomales Enzym. Adrenalin oder Na-Taurocholat hatten keinen Einfluß auf die Aktivität dieser Lipase (94).

Dieser Überblick macht deutlich, daß über die Natur und Regulation der Lipasen, und hier insbesondere der Lipasen des Skelettmuskels, noch unzureichende Kenntnisse vorliegen. Die vorliegende Arbeit hatte deshalb zum Ziel, eine Lipase für den Triglyceridabbau des Skelettmuskels anzureichern und näher zu charakterisieren. Diese Untersuchungen sollten auch klären, ob die Lipolyse im Skelettmuskel - ähnlich wie im Herzmuskel und Fettgewebe - hormonell reguliert wird. Anhaltspunkte hierfür hatten sich aus Perfusionsexperimenten des Rattenhinterbeines ergeben, in denen Isoproterenol zu erhöhter Glycerinfreisetzung in das Perfusionsmedium führte (95). Auch in anderen Untersuchungen wurden inzwischen Hinweise auf die Existenz einer hormonsensitiven Lipase des Skelettmuskels erhalten (95a).

B. METHODEN

1. Verwendete Reagenzien, Geräte und Versuchstiere

1.1. Reagenzien

Die folgenden aufgeführten Firmen lieferten die hier verwendeten Substanzen.

Deutsche Abbott, Ingelheim am Rhein: Nembutal

Amersham-Buchler, Braunschweig: Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat, (2-^{3}H) glyceryl trioleat, ^{14}C-Ölsäure, ^{3}H-Glycerin, Cholesteryl(1-^{14}C) oleat, γ^{32}P-ATP

Apotheke des Krankenhauses München-Schwabing: Gummi arabicum, Euphyllin, Biuret-Reagenz

Behringwerke, Marburg: Immunglobulin vom Rind

Bio Rad Laboratories, München: Bio Beads SM-2

Boehringer Mannheim: Lipase aus Rhizopus arrhizus, Esterase aus Schweineleber, Acetyl-CoA, cAMP, ATP, Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase, alle weiteren Enzyme und Coenzyme für Enzymtests

Ega-Chemie, Steinheim: 1-Methyl-3-isobutyl-xanthin (IBMX)

Fisher Scientific, Fair Lawn (New Jersey): Cutscum (Di-iso-octyl-phenoxyäthanol)

Fluka, Buchs: Ammoniumpersulfat, N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis), N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)

Hoechst Frankfurt: Depot-Insulin

Hoffmann-La Roche, Grenzach: Heparin

ICI, Frankfurt: Lubrol-PX

Merck, Darmstadt: Triton X-100 für die Gaschromatographie, Triton X-405, Äthylendinitrilo-tetraessigsäure Di-Na-Salz (Titriplex III, EDTA), Zinkacetat ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2\ H_2O$), Zinksulfat ($ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$), Natriumfluorid (NaF), Alloxan-Tetrahydrat, D-Glucose, Casein nach Hammersten, Trichloressigsäure, Ammoniumthiocyanat, Cobaltnitrat ($Co(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$), Äthylendichlorid, Folin Ciocalteus Phenolreagenz, Glycin, 2,5-Diphenyloxazol (PPO), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Bromphenolblau, Glycerin, System Glucose (Glucosedehydrogenase-Methode)

Merz und Dade, München: Lab-trol

Miles, Frankfurt: Clinisticks

Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland (Ohio): L-α-Phosphatidyl-L-Serin

Packard Instrument, Frankfurt: Dimethyl-POPOP, Permablend III

Pharmacia, Uppsala: Sepharose 6B, Dextranblau 2 000

Rhein-Pharma Arzneimittel, Heidelberg: D,L-Propranolol

Roth, Karlsruhe: Ölsäure nat. 98 %, L-α-Lecithin, Lysolecithin, Glycocholat, Ammoniumsulfat p.a., Nilblau A-Sulfat

Serva, Heidelberg: Triolein 95 % (frei von Ölsäure, Lipasesubstrat), Triton WR 1 339, Taurocholsäure Na-Salz, Rinderserumalbumin, Protaminsulfat, Alu-Gel-S (Aluminiumhydroxyd C_γ-Suspension 2 %), Dodecylsulfat Na-Salz, D,L-Isoproterenol · HCl, Coomassie Brilliant Blau R 250, p-Hydroxymercuribenzoat (pHMB), N-Äthylenglycol-bis(2-aminoäthyläther)N,N'-tetraessigsäure (EGTA), Ferritin aus Pferdemilz reinst, Apoferritin aus Pferdemilz rein, Acrylamid, Tween 20, 40, 60, 80

Sigma, München: L-α-Phosphatidylinosit, Palmityl-L-carnitin-chlorid, Spermin, Spermidin, Putrescin, Cholesteryloleat, Oleoyl-CoA, Proteinkinase aus Rinderherz cAMP-abhängig

Whatman Biochemicals über Vetter, Wiesloch: DE 52-Cellulose

1.2. Geräte

Scintillationszähler Packard Tricarb Model 3 385 (Packard, Frankfurt)
Hettich-Zentrifuge Rotanta/S (Hettich, Tuttlingen)
Ultraturrax-Homogenisator (Jahnke und Kunkel, Staufen im Breisgau)
Mikrodismembrator (Braun, Melsungen)
Sonifier (Branson, Soest (Holland))
Sorvall-Kühlzentrifuge Superspeed RC-2B (Sorvall, Norwalk (USA))
Beckman-Zentrifuge L 65B, Spannungsgeber für Elektrophorese Spinco Duostat (Beckman, Palo Alto (Kalifornien))
Fraktionssammler, Schlauchpumpe (LKB, Stockholm)
Säulen
Eppendorf-Zentrifuge 3 200, Eppendorf-Rotationsmischer 3 300, Eppendorf-Thermostat 3 401, Eppendorf-Photometer 1 101 M mit Küvettenwechselautomat 2 705 und Kompensationsschreiber 6 511, Substratautomat (Eppendorf-Gerätebau Netheler und Hinz, Hamburg)
Dünnschicht-Kieselgel G-Fertigplatten (Merck, Darmstadt)
Dünnschicht-Trennkammer
Elektrophorese-Aparatur (Eigenbau)
Rotationsverdampfer Büchi (Fawil (Schweiz)
Whirl-Mix (Cenco Deutschland, Haan/Rheinland)
Mettler Waage H 20 T Analysenwaage (Spoerhase, Gießen)
p_H-Meter, WTW p_H Digi 510 (Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim)
Zeiss Spektralphotometer PM 4 (Zeiss, Oberkochen)
Schüttelwasserbad

1.3. Versuchstiere

Sprague Dawley Ratten, männlich (Jautz, Kisslegg)
Zuchtfutter Herilan^R (Kraftfutterwerk Eggermann, Rinteln)

2. Bestimmung der Lipaseaktivität mit Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat als Substrat

2.1. Prinzip

Die aus Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat durch die enzymatische Reaktion freigesetzte ^{14}C-Ölsäure wird mit Chloroform-Methanol-Benzol im Alkalischen extrahiert und im Scintillationszähler gemessen. Tri-, Di- und Monoolein befinden sich in der unteren der beiden Phasen.

2.2. Testbedingungen (nach Khoo et al. (96) modifiziert)

2.2.1. Testreagenzien

2.2.1.1. Substrat: Trioleinemulsion mit Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat

Zu 20 µMol Triolein (Molekulargewicht 885) wurden 30 µl Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat in Heptan (s.A. 250 µCi/2,5 ml Heptan) ≙ 3 µCi gegeben, mit Preßluft das Heptan abgedampft und 0,5 ml 10 %iges Gummi arabicum und 0,5 ml H_2O dazupipettiert. Daraufhin wurde 2 x 30 sek mit dem Sonifier unter Kühlung beschallt. Eine solche Emulsion wurde täglich frisch angesetzt.

2.2.1.2. Muskel 14 000 g Überstand (nach Jato-Rodriguez et al. (94) modifiziert)

In flüssiger Luft aufbewahrte Rattenhinterbeinmuskel wurden am Mikro-Dismembrator zerkleinert. 2 g der zerkleinerten Muskelprobe wurden in 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 suspendiert und auf 10 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 2,5 ml 5 %iger Triton X-100-Lösung in 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 wurde die Mischung 10 min im Eisbad gerührt und 20 min bei 14 000 g zentrifugiert. Der 14 000 g Überstand wurde in den Enzymtest eingesetzt.

2.2.2. Inkubationsansatz und dessen Aufarbeitung

In ein mit Schliffstopfen verschließbares 5 ml-Glasröhrchen

wurden pipettiert: 0,1 ml 20 mM Trioleinemulsion (s.A. ~0,15 μCi/μMol), 0,1 ml 300 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5, 0,1 ml 10 %iges dialysiertes Rinderserumalbumin (als Akzeptor der freigesetzten Fettsäuren), 0,2 ml Muskel 14 000 g Überstand der Triton X-100-Konzentration 1 %. Der Reagenzienleerwert enthielt anstelle des Muskel 14 000 g Überstandes eine 1 %ige Triton X-100-Lösung in Na-Phosphat-Puffer (Gesamtvolumen 0,5 ml).

Der Zusatz von Triton X-100 erwies sich nicht nur für die Extraktion, sondern auch für die Aktivität der Lipase als essentiell. Die hier durch den Muskelextrakt eingebrachte Triton X-100-Konzentration im Testansatz liegt bei 0,4 %. Sie entspricht der für den Lipasetest optimalen Konzentration, wie sie in den Versuchen der Abbildung 5 ermittelt wurde.

Die Ansätze wurden 60 min im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert, mit 3 ml Chloroform-Methanol-Benzol 2 : 2,4 : 1 unter Zusatz von 0,3 μMol unmarkierter Ölsäure gestoppt, 0,1 ml 1 N NaOH zugesetzt, 15 sek auf dem Whirl-Mix geschüttelt und 10 min bei 2 500 g und Zimmertemperatur zentrifugiert. 1 ml der oberen Phase wurden mit 15 ml Scintillator-Lösung (4 g Permablend III/ 700 ml Toluol + 300 ml Methanol) im Scintillationszähler 5 min gezählt. Ein Standard der jeweils verwendeten Emulsion wurde zur Berechnung jeder Versuchsreihe mitgemessen.

2.3. Prüfung des Tests

In der oberen Phase wurden 93 % der eingesetzten Fettsäuren wiedergefunden.

Die Prüfung des Tests wurde mit dem 14 000 g Überstand (hergestellt nach Meth. 2.2.1.2.), den Zwischenstufen der Lipaseanreicherung und der reinsten Fraktion (Lipase VII, vergl. Erg. I.2.) durchgeführt.

Für die angereicherte Lipase VII galten die folgenden Kriterien: Unter den gewählten Testbedingungen verlief die Oleatfreisetzung über 90 min linear (Abb. 1). Die Proteinabhängigkeit hatte

einen geringen sigmoidalen Verlauf (Abb. 2). Das p_H-Optimum lag bei p_H 8,5 (Abb. 3). Die Abhängigkeit von der Substratkonzentration ergab im Anfangsbereich eine typische hyperbolische Sättigungskurve, die jedoch im Bereich höherer Substratkonzentrationen eine Substrathemmung aufwies. Die maximale spezifische Aktivität wurde bei 2 - 4 mM gefunden (Abb. 4). Die Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Triton X-100-Konzentration wies ein Maximum bei 0,2 - 0,4 % auf (Abb. 5).

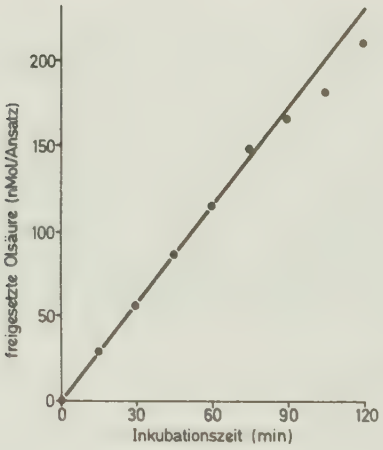


Abb. 1: Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Inkubationsdauer

Inkubationsansatz: 0,1 ml 20 mM Trioleinemulsion, 0,1 ml 300 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 8,5, 0,1 ml 10 %iges dialysiertes Rinderserumalbumin, 0,1 ml 1 %iges Triton X-100, 0,1 ml Lipase VII ≙ 0,065 mg Protein. Durchführung des Tests nach Meth. 2.2.2., Inkubationsdauer wie angegeben.

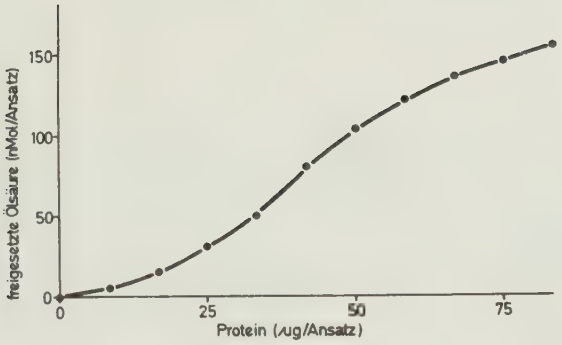


Abb. 2: Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Proteinkonzentration
Testbedingungen wie in Abb. 1, jedoch mit wechselnden Proteinmengen wie angegeben.

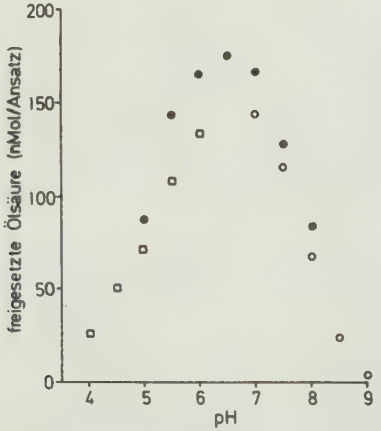


Abb. 3: Abhängigkeit der Lipaseaktivität vom p_H-Wert
Testbedingungen wie in Abb. 1, jedoch mit wechselnden Puffern (□ Acetat-Puffer, ● Na-Phosphat-Puffer, ○ TRIS-HCl-Puffer, je 300 mM) und p_H-Werten wie angegeben.

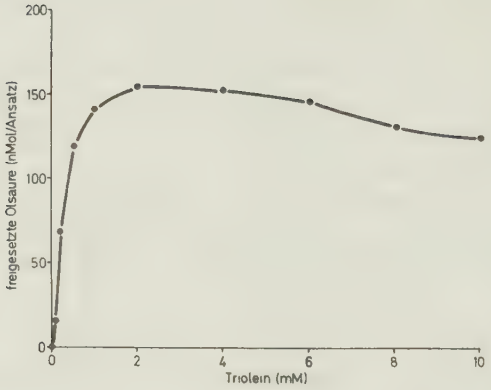


Abb. 4: Abhängigkeit des Lipasetests von der Substratkonzentration
Testbedingungen wie in Abb. 1, Substratmengen wie angegeben.

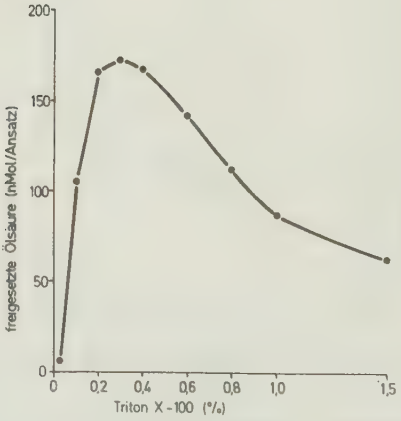


Abb. 5: Abhängigkeit des Lipasetests von der Triton X-100-Konzentration
Testbedingungen wie in Abb. 1, wechselnde Mengen an Triton X-100 wie angegeben.

3. Bestimmung der Lipaseaktivität mit (2-^{3}H)Glyceryl trioleat als Substrat

3.1. Prinzip

In diesem Test wird das durch Hydrolyse von (2-^{3}H)Glyceryl trioleat freigesetzte ^{3}H-Glycerin gemessen. Tri-, Di- und Monolein werden mit einer Mischung von Hexan-Äther-Äthanol abgetrennt und die wäßrige Phase, die das Glycerin enthält, im Scintillationszähler gemessen.

3.2. Testbedingungen (nach Noma et al. (97) modifiziert)

Die Herstellung der Testreagenzien und die Testbedingungen waren dieselben wie unter Methoden 2.2. beschrieben. (2-^{3}H)Glyceryl trioleat (s.A. 1 mCi/ml Heptan) wurde in einer Menge von 10 µCi/ml Emulsion zugesetzt, sodaß die spezifische Aktivität der Emulsion ~0,45 µCi/µMol betrug.

Nach 60 min Inkubation (Inkubationsansatz vergl. Meth. 2.2.2.) bei 37°C wurde mit 1,5 ml Hexan-Äther-Äthanol 1 : 1 : 1 + 0,15 µMol nicht radioaktiv markierter Ölsäure gestoppt. Es wurde 15 sek auf dem Whirl-Mix geschüttelt und 10 min bei 2 500 g und Zimmertemperatur zentrifugiert. 0,5 ml der unteren Phase wurden wie unter Methoden 2.2.2. beschrieben gemessen.

3.3. Prüfung des Tests

In der unteren Phase wurden 85 % des eingesetzten Glycerins wiedergefunden.

Die Abhängigkeit des Lipasetests von der Zeit, der Proteinkonzentration und der Substratkonzentration erbrachte ähnliche Ergebnisse wie der Test mit Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat als Substrat.

4. Bestimmung der Lipoproteinlipaseaktivität

4.1. Prinzip

Nach Ehnholm et al. (75) wird im Lipoproteinlipasetest Triolein (+ Tracermengen an Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat) als Substrat verwendet. Im Gegensatz zur Lipase benötigt die Lipoproteinlipase Serum als Aktivator, das dem Test zugesetzt werden muß. Freigesetzte ^{14}C-Ölsäure wird vom Testgemisch wie unter Methoden 2.2.2 beschrieben abgetrennt.

Als Lipoproteinlipasepräparat zur Aufstellung des Tests wurde Postheparinplasma der Ratte verwendet.

4.2. Testbedingungen (nach Ehnholm et al. (75) modifiziert)

Die Herstellung der Testreagenzien erfolgte wie unter Methoden 2.2.1. beschrieben. 10 ml Humanserum wurden über Nacht gegen 0,9 %ige NaCl-Lösung dialysiert.

4.2.1. Gewinnung von Postheparinplasma der Ratte (nach Fielding (98))

400 µg Heparin, gelöst in 0,4 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung (≙ 1 500 U/Tier) wurden in die Schwanzvene einer Ratte gespritzt. Nach 5 min wurde das Blut aus der dorsalen Aorta abgenommen (Eiskühlung!), 1/20 Volumen 250 mM Na-Citrat zugegeben und anschließend 30 min bei 2 500 g zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde gesammelt und bei Bestimmung der Lipoproteinlipaseaktivität am gleichen Tage bis zur Inkubation im Eisbad aufbewahrt oder für den Enzymtest an einem der folgenden Tage (max. 10 Tage nach Gewinnung) bei -20°C eingefroren.

4.2.2. Inkubationsansatz und dessen Aufarbeitung

In ein mit Schliffstopfen verschließbares 5 ml-Glasröhrchen wurden pipettiert: 0,1 ml 20 mM Trioleinemulsion (s.A. ~0,15 µCi/µMol), 0,1 ml TRIS-HCl-Puffer (p_H 8,4, 1 M, enthaltend 5 U Heparin), 0,1 ml 10 %iges dialysiertes Rinderserumalbumin, 0,05 ml dialysiertes Humanserum, 0,04 ml Postheparinplasma, 0,11 ml

0,9 %ige NaCl-Lösung (Gesamtvolumen 0,5 ml). Nach Inkubation des Ansatzes bei 28°C wurde wie unter Methoden 2.2.2. beschrieben aufgearbeitet.

4.3. Prüfung des Tests

Die Abhängigkeit des Lipoproteinlipasetests von der Proteinkonzentration ist in Abbildung 6 dargestellt.

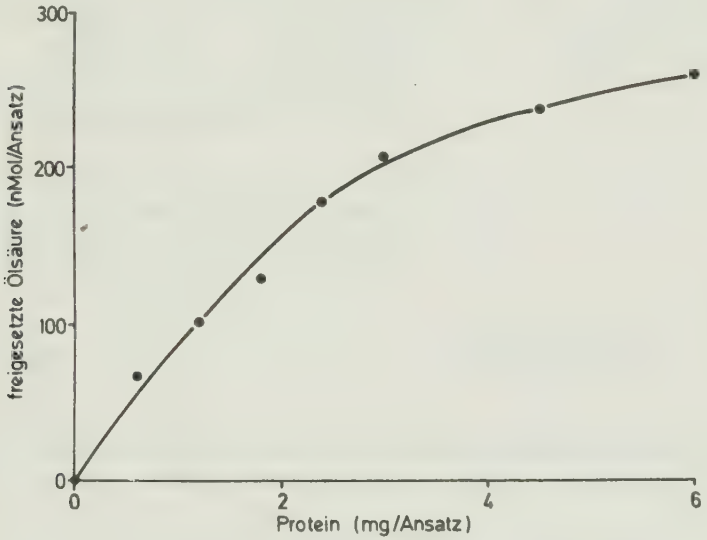


Abb.6: Abhängigkeit des Lipoproteinlipasetests von der Proteinkonzentration
Inkubationsbedingungen wie unter Meth. 4.2.2., jedoch mit wechselnden Proteinmengen.

Die Wirkung der typischen Lipoproteinlipase-Inhibitoren 1 M NaCl und Protaminsulfat ist mit den Angaben in der Literatur vergleichbar (99). Noma et al. (97) setzten dem Lipoproteinlipasetest in Postheparinplasma noch zusätzlich Plasma, Fielding (100) zusätzlich Serum als Aktivator zu. Nach Kraus et al. (101) war ein Serumzusatz nicht erforderlich. Wir fanden mit kleineren Mengen an Serum eine deutliche Aktivierung, mit großen

Mengen keinen Effekt (Tab. 1).

Noma et al. (97) und Kraus et al. (101) testeten die Lipoproteinlipase in Anwesenheit von 0,025 % bzw. 0,045 % Triton X-100. Wir fanden bei 0,2 % Triton X-100 eine fast vollständige Hemmung des Enzyms (Tab. 1).

Tab. 1: Inhibitoren der Lipoproteinlipase (Postheparinplasma)

Zusatz	Serum (µl/Ansatz)	relative Aktivität (%)
-	50	100
-	100	63,2
-	0	62,5
1 M NaCl	50	35,2
750 µg Protaminsulfat/ml	50	49,4
1500 µg Protaminsulfat/ml	50	28,9
0,2 % Triton X-100	50	≦ 1

Inkubationsbedingungen wie unter Meth. 4.2.2. Eine s.A. von 72,4 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.

5. Berechnung der lipolytischen Aktivität

5.1. Für Lipase mit Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat als Substrat und Lipoproteinlipase

$$\text{s.A.} = \frac{\text{cpm/60 min} \times \text{Ges.vol. der oberen Phase (ml)} \times 3 \times \text{eingesetzte kalte TO-Menge (µMol)} \times 1000}{\text{eingesetzte Enzymmenge (ml)} \times \text{im Scintillationszähler gemessenes Volumen (ml)} \times \text{eingesetzte radioaktive TO-Menge (cpm/Ink.ansatz)} \times \text{mg Prot/ml}}$$

(n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)

Gesamtvolumen der oberen Phase = 1,7 ml
Anzahl der pro Triolein freisetzbaren Fettsäuren = 3

eingesetzte kalte Trioleinmenge = 2 µMol
eingesetzte Enzymmenge:
für Lipase ≦ 0,2 ml
für Lipoproteinlipase ≦ 0,15 ml

5.2. Für Lipase mit (2-^{3}H)Glyceryl trioleat als Substrat

$$\text{s.A.} = \frac{\text{cpm/60 min} \times \text{Ges.vol. der unteren Phase (ml)} \times 1 \times \text{eingesetzte kalte TO-Menge (µMol)} \times 1000}{\text{eingesetzte Enzymmenge (ml)} \times \text{im Scintillationszähler gemessenes Volumen (ml)} \times \text{eingesetzte radioaktive TO-Menge (cpm/Ink.ansatz)} \times \text{mg Prot. ml}}$$

(n Mol Glycerin/mg Prot. x 60 min)

Gesamtvolumen der unteren Phase = 0,9 ml
Anzahl der pro Triolein freisetzbaren Glycerinmoleküle = 1
eingesetzte kalte Trioleinmenge = 2 µMol
eingesetzte Enzymmenge ≦ 0,2 ml

6. Proteinbestimmung

6.1. Modifizierte Biuret-Methode zur Entfernung von Lipid-Trübungen (nach Weiss (102))

1 ml Dioxan + x ml Proteinlösung (20 - 400 µg, wobei x = 0,01 - 0,5 ml) wurden 5 min auf dem Eppendorf-Rotationsmischer geschüttelt, der Niederschlag in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit 1 ml 0,3 M Trichloressigsäure versetzt, 5 min auf dem Eppendorf-Rotationsmischer geschüttelt, der Niederschlag in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Niederschlag wurde in 1 ml Biuret-Reagenz durch Schütteln auf dem Eppendorf-Rotationsmischer gelöst und gegen einen Biuret-Leerwert bei 546 nm photometriert. Als Standard wurde Lab-trol verwendet.

6.2. Modifizierte Lowry-Methode (nach Dulley et al. (103))

In Anwesenheit von Triton X-100 ist die Proteinbestimmung nach

Lowry et al. (104) gestört. E_{578} ist verglichen mit dem Wert ohne Triton X-100 reduziert (bis zu 4 % Glycerin beeinflußt nach unseren Messungen die Lowry-Proteinbestimmung nicht). Es wird ein gelbes Präzipitat bei Zugabe des Folin Ciocalteus Phenolreagenzes gebildet. Zugabe von 0,5 % SDS zum Alkalireagenz nach Dulley et al. (103) verhindert die Niederschlagsbildung ohne Beeinflussung der Farbentwicklung.

Bestimmungsansatz: 0,85 ml Proteinlösung (5 - 50 µg Protein) + 0,15 ml 3 N Trichloressigsäure wurden 10 min im Eisbad gehalten und der Niederschlag in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Zum Niederschlag wurden 0,05 ml 10 %iges SDS gegeben und 1 ml Lösung C((25 ml Lösung A (2 %ige Na_2CO_3-Lösung in 0,1 N NaOH) + 0,5 ml Lösung B (1 ml 1,35 %ige wässrige Seignettesalzlösung + 0,1 ml 5,5 %ige wässrige $CuSO_4$-Lösung)). Nach 10 min wurden 0,1 ml Folin Ciocalteus Phenolreagenz (1 : 1 verdünnt mit H_2O) zugegeben und 25 min bei 37°C inkubiert. Gestoppt wurde durch Abkühlen im Eisbad. Eventuell ausfallendes SDS ließ sich durch leichtes Erwärmen wieder in Lösung bringen. Photometriert wurde bei 578 nm. Die Berechnung erfolgte mittels parallel angefertigter Eichkurve, wobei Lab-trol als Standard diente.

7. Triton X-100-Bestimmung (nach Garewal (105))

Stammlösungen:
Triton X-100-Standard: 2 mg Triton X-100/ml 50 %iges Äthanol, 0,2 mg Triton X-100/ml 50 %iges Äthanol
Rinderserumalbumin-Standard: 4 mg Rinderserumalbumin/ml H_2O, 0,4 mg Rinderserumalbumin/ml H_2O
Ammonium-cobalt-thiocyanat-Reagenz: 17,8 g NH_4SCN + 2,8 g $Co(NO_3)$ x 6 H_2O ad 100 ml

Bestimmungsansatz (gegenüber der Originalvorschrift auf die Hälfte reduziert): 0,15 ml Triton X-100 in 50 %igem Äthanol (20 - 200 µg Triton X-100) + 0,2 ml Ammonium-cobalt-thiocyanat-Lösung wurden 5 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann

0,75 ml Äthylendichlorid zugegeben, 2 min auf dem Eppendorf-Rotationsmischer geschüttelt und 2 min mit der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die untere Phase wurde bei 622 nm und 687 nm photometriert. $E_{622 - 687}$ ist proportional der Triton X-100-Menge.

Die Triton X-100-Bestimmung wurde in Gegenwart von Rinderserumalbumin überprüft. Die Werte entsprachen den Angaben bei Garewal (105).

8. Entfernung von Triton X-100 aus Lipaselösungen

Nach Holloway (106) wurde die Triton X-100-haltige Lipaselösung 2 - 3 Stdn im Kühlraum mit Bio Beads SM-2 gerührt. Für eine Lösung, die 1 % Triton X-100 enthält, verwendeten wir 0,4 g Bio Beads SM-2/ml.

Die Triton X-100-Entfernung aus rinderserumalbuminhaltiger Lösung wurde überprüft. Rinderserumalbumin wurde nicht an die Bio Beads SM-2 adsorbiert; Triton X-100 war nach 2 Stdn zu 95 % aus der Lösung entfernt.

9. Bestimmung der Cholesteryloleat-Hydrolase-Aktivität

Prinzip

Die aus Cholesteryl(1-^{14}C)oleat freigesetzte ^{14}C-Ölsäure wird mit Chloroform-Methanol-Benzol im Alkalischen extrahiert und im Scintillationszähler gemessen. Cholesteryloleat befindet sich in der unteren der beiden Phasen.

Testbedingungen wie unter Methoden 2.2. beschrieben.

10. Bestimmung der Oleoyl-CoA- und Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität

10.1. Prinzip

Das aus Oleoyl-CoA bzw. Acetyl-CoA durch Hydrolaseaktivität freigesetzte CoA-SH wird durch die enzymatische Hilfsreaktion CoA-SH + α-Ketoglutarat + NAD^+ $\xrightarrow{\alpha\text{-KGDH}}$ Succinyl-CoA + NADH + H^+ im optischen Test bestimmt (107).

10.2. Testbedingungen

In ein Eppendorf-Cup wurden pipettiert: 20 µl 20 mM Oleoyl-CoA bzw. Acetyl-CoA in 5 %iger Gummi arabicum-Lösung, 20 µl 300 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5, 20 µl 10 %iges dialysiertes Rinderserumalbumin, 10 bzw. 20 µl Lipase VII (siehe Erg. I.2. ≙ 0,013 mg Prot.), 25 bzw. 15 µl 1 %iges Triton X-100, 5 µl 500 mM Mercaptoäthanol. Als Reagenzienleerwert diente ein Ansatz ohne Lipase, jedoch mit 35 µl 1 %igem Triton X-100 (Gesamtvolumen 0,1 ml).

Die Ansätze wurden 60 min bei 37°C inkubiert, mit 20 µl 35 %iger $HClO_4$ gestoppt und mit $KHCO_3$ neutralisiert. Nach Zusatz von 5 µl 500 mM Mercaptoäthanol wurde im Überstand CoA-SH gemessen. Die Reaktion wurde mit 5 µl α-KGDH aus Herzmuskel gestartet.

Zum Inkubationsansatz zugesetztes CoA-SH in Konzentrationen von 4, 8, 12, und 16 n Mol/0,1 ml Inkubationsvolumen wurde im Mittel zu 87 % wiedergefunden.

11. Herstellung der Gele für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Gele sind 4 %ig an Acrylamid, haben einen Durchmesser von 0,6 cm und eine Länge von etwa 8 cm.

11.1. Gele ohne Triton X-100 (nach Maurer (108), System 1, ohne Sammelgel)

Stammlösungen:
Lösung 1: 48 ml 1 N HCl, 36,3 g TRIS + 0,23 ml TEMED nach Einstellen des p_H-Wertes auf 8,9 mit 1 N HCl mit H_2O auf 100 ml auffüllen.
Lösung 2: 16 g Acrylamid + 0,42 g Bis mit H_2O auf 100 ml auffüllen.
Lösung 3: 0,14 g Ammoniumpersulfat mit H_2O auf 100 ml auffüllen.
Lösung 4: 6 g TRIS + 28,8 g Glycin mit H_2O auf 1 l auffüllen. Der p_H-Wert sollte bei 8,3 liegen. Verwendet wurde eine 10 %ige wässrige Lösung.

Als Ansatz für 6 Gele wurden 1,5 ml Lösung 1, 3 ml Lösung 2, 1,5 ml H_2O und 6 ml Lösung 3 gemischt. Nach dem Entlüften wurde die Mischung in die unten verstopften Glasröhrchen gefüllt und darüber ein Tropfen H_2O gegeben. Die Lösung erstarrte innerhalb von 30 - 60 min.

11.2. Triton X-100-haltige Gele (nach Dewald et al. (109) modifiziert)

Stammlösungen:
Lösung 1, 2, 3 wie unter Methoden 11.1. beschrieben.
Lösung 4: 3 g TRIS + 14,4 g Glycin mit H_2O auf 1 l auffüllen. Der p_H-Wert sollte 8,2 - 8,4 sein.

Als Ansatz für 6 Gele wurden 1,5 ml Lösung 1, 3 ml Lösung 2, 0,2 ml 10 %iges Triton X-100 in H_2O, 1,38 ml H_2O und 6 ml Lösung 3 gemischt und wie unter Methoden 11.1. beschrieben weiterbehandelt.

11.3. Triolein- und Triton X-100-haltige Gele zu Lipasenachweis im Gel (nach Lakshmi et al. (110) modifiziert)

Lösung 1, 2, 3 wie unter Methoden 11.1., Lösung 4 wie unter Methoden 11.2. beschrieben.

Als Ansatz für 6 Gele wurden 1,5 ml Lösung 1, 3 ml Lösung 2, 0,12 ml 10 %iges Triton X-100 in H_2O, 1,38 ml H_2O und 0,15 ml

Triolein (≙ 137,3 mg, D = 0,915) gemischt. Es wurde durch Beschallen aus diesen Komponenten eine Emulsion hergestellt und dann 6 ml Ammoniumpersulfat (300 mg/100 ml) zugegeben. Nach dem Mischen und Entlüften wurde die Emulsion in die unten verstopften Glasröhrchen eingefüllt.

12. Untersuchungen zur Regulation der Muskellipase

12.1. Ganztierversuche

12.1.1. Verschiedene Fütterungsbedingungen

In drei Versuchen wurde je 8 männlichen Ratten der Gewichtsklasse 150 - 200 g 48 Stdn das Futter entzogen. Danach wurden je 2 Ratten 24 Stdn ad libitum entweder mit Speck oder gekochtem Eiklar-Eiweiß oder Zwieback gefüttert. 2 Ratten hungerten weiter über diesen Zeitraum. 2 während der ganzen Zeit normal gefütterte Tiere dienten als Kontrollen.

12.1.2. Alloxandiabetische Tiere

Zur Erzeugung des Diabetes wurde 24 Stdn gehungerten männlichen Ratten (140 - 160 g Gewicht) 100 mg Alloxan/kg in 0,9 %iger NaCl-Lösung in die Schwanzvene gespritzt. 24 Stdn danach wurden die Tiere 7 Tage lang morgens und abends je nach Bedarf (Urinkontrolle mit Clinisticks) mit 1 - 2 I.E. Depot-Insulin subcutan in die Nackenfalte eingestellt. Akut dekompensierte Tiere wurden durch Insulinentzug 24 Stdn vor Tötung erhalten, während die Kontrollen die letzte Insulininjektion 1 Std vor dem Schlachten erhielten.

12.1.3. Isoproterenol-Stimulierung

Um die Hormonsensitivität der Muskellipase zu prüfen, erhielten gefütterte Ratten 200 μg des Lipolysestimulators D,L-Isoproterenol in 0,5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung in eine Schwanzvene gespritzt. Ein anderes Kollektiv erhielt den ß-Blocker D,L-Pro-

pranolol in gleicher Menge als Lipolysehemmer. In den Kontrollen wurde 0,9 %ige NaCl-Lösung injiziert. Bei Annahme einer Blutmenge von 10 ml pro Ratte entsprachen die Konzentrationen der Wirkstoffe im Blut 0,04 mM für die wirksame L-Form.

2.1.4. Entnahme und Aufarbeitung der Muskelproben für die Lipasebestimmung

Unter Nembutal-Narkose (0,1 ml Nembutal i.p. gespritzt/100 g Ratte) - für Tabelle 20 in 2 Versuchen Äther-Narkose - wurden, wenn nicht anders angegeben, 15 - 30 min nach Injektion die Hinterbeinmuskel entnommen, schnell von sichtbaren Fetteinlagerungen befreit und in flüssige Luft geworfen. Die weitere Aufarbeitung für den Lipasetest erfolgte am gleichen Tage wie unter Methoden 2.2.1.2. beschrieben, jedoch wurde das Homogenat 45 min bei 100 000 g zentrifugiert.

2.2. In vitro Versuche mit Rattenzwerchfell

Die Wirkung von Isoproterenol auf die Muskellipase wurde in vitro am Rattenzwerchfell studiert. Für jeden Versuch wurden die Diaphragmen aus 8 gefütterten Ratten herausgetrennt, jeweils in der Mitte geteilt und jeweils die eine Hälfte in 10 ml, mit bzw. ohne Isoproterenol 15 min im Schüttelwasserbad bei 37°C unter Carbogen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Hemidiaphragmen in flüssige Luft gegeben und am gleichen Tage wie unter Methoden 2.2.1.2. beschrieben aufgearbeitet.

Inkubationsmedium: 10 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer p_H 7,35 nach Krebs et al. (111) + 4 % Rinderserumalbumin + 0,1 % Glucose wurden vor Gebrauch 10 min mit Carbogen begast und mit 0,1 ml 10 mM D,L-Isoproterenol bzw. 0,1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung versetzt.

2.3. Versuche zur Aktivierung von Muskellipase durch ATP-abhängige Phosphorylierung

12.3.1. Versuche mit 100 000 g Überstand ohne Zusatz von Proteinkinase

Die Zusammensetzung der Aktivierungsmischung nach Tsai et al. (112) und Khoo et al. (16), (113) wurde modifiziert.

Die Endkonzentration der Zusätze im Aktivierungsansatz (bestehend aus 0,3 ml Aktivierungsmischung + 0,6 ml 100 000 g Muskel-Überstand) betrug: 0,3 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, 0,03 mM cAMP, 1 mM Euphyllin, 1 mM DTE, 0,5 mM EGTA, 2,5 mM PEP, 20 U/ml Pyruvatkinase, 50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl-Puffer p_H 7,0.

Der Aktivierungsansatz wurde 10 min bei 30°C im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend der Lipasetest wie unter Methoden 2.2.2. beschrieben durchgeführt. Die Kontrolle enthielt kein ATP, $MgCl_2$ und cAMP. Die inkubierten Proben wurden mit nicht inkubierten (0 min) verglichen.

Die Anwendung eines ATP-regenerierenden Systems (hier: PEP + Pyruvatkinase) war erforderlich, um den ATP-Spiegel während der Inkubation bei 30°C konstant zu halten.

12.3.2. Aktivierungsversuche mit zugesetzter Proteinkinase aus Rinderherz- und Rattenskelettmuskel

Die Zusammensetzung der Aktivierungsmischung nach Khoo et al. (16), (114) wurde modifiziert.

Die Endkonzentration der Zusätze im Aktivierungsansatz (bestehend aus 0,2 ml Lipase 6 ≙0,5 mg Protein + 0,8 ml Aktivierungsmischung) betrug: 0,5 mM ATP, 5 mM Mg-acetat, 0,01 mM cAMP, 1 mM IBMX, 1 mM DTE, 0,5 mM EGTA, 50 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 7,4, Proteinkinase (aus Rinderherzmuskel: 0,06 mg/ml, aus Rattenskelettmuskel hergestellt nach Methoden 12.4.: 0,03, 0,06 bzw. 0,12 mg/ml).

Der Aktivierungsansatz wurde 10 min im Schüttelwasserbad bei 30°C inkubiert, danach Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt und der Lipasetest nach Methoden 2.2.2. durchgefüh

(vergl. Tab. 23, 24, 25; Ansatz 3: mit Proteinkinase 10 min). Die Kontrolle (Ansatz 2: ohne Proteinkinase 10 min) enthielt kein ATP, Mg-acetat, cAMP und keine Proteinkinase. Sie wurde mit der nicht inkubierten Kontrolle (Ansatz 1: ohne Proteinkinase 0 min) verglichen. Bei Ansatz 4 (ohne Proteinkinase 10 min, Zusätze für Lipasetest nach Inkubation) wurde eine 10 min Inkubation ohne Zusätze vorgenommen. Dem anschließenden Lipasetest wurden alle Bestandteile des Aktivierungsansatzes zugesetzt.

2.4. Präparation von Proteinkinase aus dem Rattenhinterbeinmuskel (nach Reimann et al. (115) und Kinzel et al. (116))

140 g Rattenhinterbeinmuskel wurden in 70 g-Portionen mit je 210 ml 4 mM EDTA + 2 mM DTE p_H 7,0 10 x 20 sek gestarmixt und das Homogenat 30 min bei 25 000 g zentrifugiert. Das Homogenisieren und alle folgenden Schritte wurden bei etwa 4°C durchgeführt. 350 ml Überstand wurden mit wenigen ml 1 N Essigsäure auf p_H 5,5 gebracht und dann 30 min bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand (335 ml) wurde mit 85 ml 1 M K_2HPO_4 + 1 M KH_2PO_4 + 0,2 M EDTA 1 : 1 : 1 auf p_H 6,5 - 7,0 gebracht und mit 156,4 g $(NH_4)_2SO_4$ (≙ 55 % Sättigung) gefällt. Es wurde 40 min bei 10 000 g zentrifugiert, der Niederschlag in 5 mM K-Phosphat-Puffer + 1 mM EDTA p_H 6,5 suspendiert und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert (1 x Pufferwechsel nach 2 Stdn). 13,7 ml des dialysierten Niederschlags wurden 1 Std bei 78 000 g zentrifugiert, der Niederschlag verworfen. 13 ml (= 537 mg Protein) des 78 000 g Überstandes wurden auf eine mit 5 mM TRIS-HCl + 1 mM EDTA p_H 7,5 äquilibrierte DE 52-Cellulose-Säule (2 x 15 cm) gegeben. Es wurde zunächst mit dem Äquilibrierungs-Puffer gewaschen, bis sich im Eluat kein Protein mehr befand (etwa 130 ml) und dann der Gradient angelegt (500 ml 0 - 500 mM TRIS-HCl + 1 mM EDTA p_H 7,5). Bei Beginn des Proteinkinase-Proteins wurde das Fraktionsvolumen von bisher 10 ml auf 5 ml verringert. Bei einer Cl^--Konzentration von 300 mM waren beide Proteinkinase-Fraktionen eluiert (Abb. 7).

Durch Chromatographie an DE 52-Cellulose ließ sich die Proteinkinase in 2 Fraktionen, Proteinkinase I und Proteinkinase II,

auftrennen. Dabei war die beste Fraktion der Proteinkinase I 66-fach (s.A. = 0,929 n Mol ^{32}P eingebaut/mg Prot. x min) mit einer Ausbeute von 16,7 % und die beste Fraktion der Proteinkinase II 52-fach (s.A. = 0,732 n Mol ^{32}P eingebaut/mg Prot. x min) mit einer Ausbeute von 7,3 % gegenüber dem 25 000 g Überstand angereichert. Proteinkinase I und Proteinkinase II enthielten keine Lipaseaktivität.

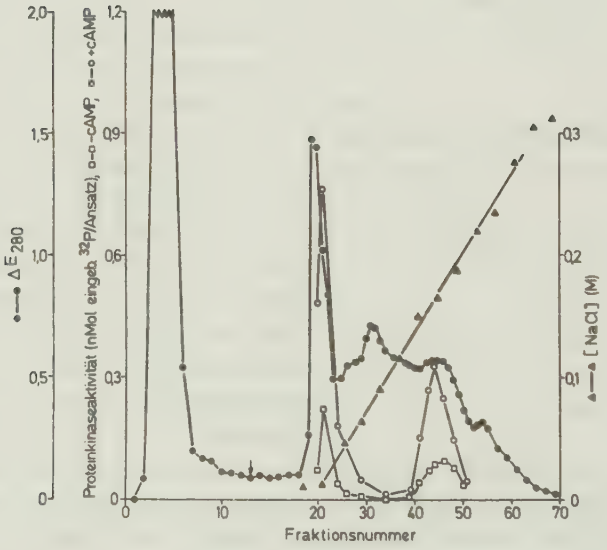


Abb. 7: Reinigung der Proteinkinase aus Rattenhinterbeinmuskel an DE 52-Cellulose

537 mg Protein wurden auf die Säule aufgetragen und die Chromatographie wie oben beschrieben ausgeführt. Der Pfeil markiert den Beginn des Gradienten.

2.5. Bestimmung der Proteinkinaseaktivität

2.5.1. Prinzip

Casein wird durch ATP mit Proteinkinase phosphoryliert. Der Nachweis von ^{32}P-Radioaktivität im säuregefällten Protein dient als Meßgröße für die Proteinkinaseaktivität.

2.5.2. Testbedingungen (Testansatz nach Reimann et al. (115), Aufarbeitung des Tests nach Mijamoto et al. (117))

In ein Eppendorf-Cup wurden pipettiert: 10 µl 500 mM L-α-Glycerophosphat p_H 6,0, enthaltend 0,6 mg Casein, 10 µl 10 mM K-Phosphat, 10 µl 3 mM EGTA, 10 µl 2 mM EDTA + 10 mM IBMX, 10 µl 200 mM NaF, 10 µl Proteinkinase, 10 µl 0,02 mM cAMP, 10 µl 100 mM Mg-acetat, 10 µl 2 mM ATP, 10 µl $\delta^{32}P$-ATP (≙ 100 000 - 200 000 cpm) (Gesamtvolumen 0,1 ml).

Nach 20 min Inkubation bei 37°C im Eppendorf-Thermostaten wurden die Proben durch Zusatz von 0,2 ml 0,625 %igem Rinderserumalbumin mit 0,5 ml 10 %iger Trichloressigsäure gestoppt, 5 min im Eisbad belassen und dann 2 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde einmal mit 1 ml 10 %iger Trichloressigsäure und ein zweites Mal mit 1 ml 10 %iger Trichloressigsäure + 0,1 ml 1 N NaOH gewaschen. Es wurde jeweils 5 min im Eisbad stehen gelassen, 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Radioaktivitätsmessung wurde der Niederschlag in 0,1 ml 1 N NaOH aufgenommen, die Lösung in ein Scintillationsgefäß überführt und unter Zusatz von 10 ml Brayscher Lösung (200 g Naphthalin, 14 g PPO, 40 ml Äthylenglycoll, 200 ml Äthanol ad 2 l mit Dioxan) im Scintillationszähler gemessen.

2.5.3. Prüfung des Tests

Unter diesen Bedingungen verlief der ^{32}P-Einbau über 20 min linear. Die Abhängigkeit des Proteinkinasetests für Proteinkinase 1 von der cAMP-Konzentration geht aus Tabelle 2 hervor. Die Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zeigt Abbildung 8.

Tab. 2: Abhängigkeit des Proteinkinasetests von der cAMP-Konzentration

cAMP im Test (mM)	Proteinkinaseaktivität [pMol eingebautes ^{32}P pro Test] - cAMP	+ cAMP
0,0000	0,030	0,177
0,002	0,041	0,165
0,02	0,036	0,060

Testbedingungen wie unter Meth. 12.5.2. beschrieben. Es wurden 14,18 µg Proteinkinase I eingesetzt.

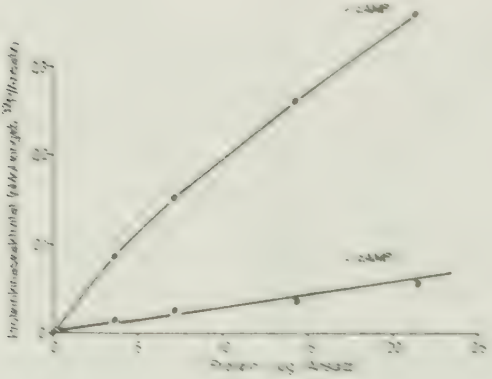


Abb. 3: Abhängigkeit des Proteinkinasetests von der Proteinkonzentration

Testbedingungen wie unter Meth. 12.5.2. beschrieben, jedoch mit wechselnden Proteinmengen von Proteinkinase I wie angegeben.

3. Triglyceridbestimmung (nach Eggstein et al. (118))

Prinzip

Das durch alkalische Hydrolyse aus Triglycerid freigesetzte Glycerin wird durch den folgenden enzymatischen Test bestimmt. Die Menge an verbrauchtem NADH ist der Glycerinkonzentration proportional.

Triglycerid + 3 H_2O $\xrightarrow[70^\circ C]{\text{Alkali}}$ Glycerin + 3 Fettsäuren

Glycerin + ATP $\xrightarrow{GK}$ Glycerin-3-P + ADP

ADP + PEP $\xrightarrow{PK}$ ATP + Pyruvat

Pyruvat + NADH + H^+ $\xrightarrow{LDH}$ Lactat + NAD^+

Stammlösungen:
2 ml Triglyceridstandard: 88,5 mg Triolein/50 ml Äthanol
0,5 N äthanolische KOH: 11,2 ml 25 %ige wäßrige KOH mit Äthanol auf 100 ml auffüllen, ca. 12 Stdn stehen lassen.
Bestimmungsansatz für die Triglyceridhydrolyse: 1 ml äthanolische KOH + 0,2 ml Probe (20 - 400 n Mol Triglycerid) - für den Leerwert 0,2 ml H_2O - wurden 30 min bei 70°C hydrolysiert, dann mit 0,2 ml 2,5 N Perchlorsäure gestoppt und 10 min im Eisbad stehen gelassen. Der Niederschlag wurde in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und im mit ~20 µl 1 N KOH neutralisierten Überstand das Glycerin gemessen.

Es wurden 103,5 % des eingesetzten Trioleins wiedergefunden.

14. Glucosebestimmung (nach Banauch et al. (119))

Prinzip

Glucose wird durch Glucose-Dehydrogenase nach folgender Gleichung oxidiert: D-ß-Glucose + NAD^+ $\xrightarrow{Gl\text{-}DH}$ D-Gluconolacton + NADH + H^+
Zusatz von Mutarotase beschleunigt den Reaktionsverlauf. Die Menge des gebildeten NADH ist der Glucosekonzentration proportional.

Die Glucosebestimmung wurde im enteiweißten Rattenserum-Überstand am Substratautomaten der Firma Eppendorf durchgeführt.

C. [illegible]

I. Reinigung und Charakterisierung einer Lipase aus dem Skelettmuskel der Ratte

1. Vorbereitende Untersuchungen

1.1. Solubilisierung der Lipase

Erste Versuche zum Nachweis einer Lipaseaktivität nach Aufschluß des Muskels mit hypotonen oder isotonischen Pufferlösungen führten nicht zum Erfolg.

Es wurden deshalb in Anlehnung an Jato-Rodriguez et al. (94) und unter Beachtung weiterer Hinweise zur Solubilisierung bzw. Aktivierung von Lipasen aus der Rattenleber von Weiss (120) und Karija et al. (121), (122) verschiedene Detergenzien auf ihre Wirksamkeit untersucht, Lipase aus dem Muskelgewebe in den 14 000 g Überstand freizusetzen. Zu den getesteten Substanzen gehörten: Cutscum, Triton X-100, Triton WR 1 339, Triton X-405, Lubrol-PX, Tween 20, 40, 60, 80, Lecithin, Lysolecithin, Taurocholat, Glycocholat und Palmitylcarnitin. Die größten Effekte zeigten Triton X-100 und Cutscum. Wie Tabelle 3 zeigt, liegt die optimale Konzentration von Triton X-100 bei 1 %. Ohne Zusatz von Triton X-100 ließ sich keine lipolytische Aktivität messen.

Tab. 3: Effekt von Triton X-100 und Cutscum auf die Extraktion von Skelettmuskellipase

Detergenz	Konzentration im Muskelhomogenat (%)	lipolytische Aktivität im 14 000 g Überstand (n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)
Cutscum	1	15,6
Triton X-100	0,5	14,0
Triton X-100	1	23,6
Triton X-100	2	11,7
-	0	0

Die Detergenzien wurden in den angegebenen Konzentrationen dem Homogenat zugesetzt, 10 min im Eisbad gerührt und der 14 000 g Überstand nach Meth. 2.2.1.2. hergestellt. Es galten die Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,2 ml 14 000 g Überstand Δ1 – 1,5 mg Protein pro Ansatz eingesetzt.

Bei sonst gleicher Aufarbeitung wurden in frisch und gefriergestoppt entnommenen Muskelproben gleiche Lipaseaktivitäten gefunden.

Für die Enzymanreicherung schien die Stabilität der solubilisierten Lipase von Interesse. Deshalb wurde Muskel 14 000 g Überstand (nach Meth. 2.2.1.2. hergestellt) bei 37°C bis zu 2 Stdn ohne Substrat stehen gelassen. Aus Tabelle 4 geht hervor, daß die Aktivität nach 2 Stdn auf etwa die Hälfte abgefallen war. Ein Zusatz von EDTA konnte die Hitzeaktivierung nicht verhindern, es wurde beim 30 min-Wert sogar eine noch um etwa 11 % niedrigere Aktivität gefunden.

Tab. 4: Stabilität der Muskellipase

Inkubationsdauer bei 37°C (min)	relative Aktivität (%)
0	100
15	82,3
30	76,2
60	67,7
120	50,2
30 + 5 mM EDTA	65,5

Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,2 ml 14 000 g Überstand ≙ 1,14 mg Protein pro Ansatz eingesetzt. Eine s.A. von 25,4 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.

1.2. Lipaseaktivität in verschiedenen Spezies

Da die Gewinnung genügender Muskelmengen bei der Ratte für die

Anreicherung der Lipase limitiert ist, wurde die Lipaseaktivität in Muskeln anderer Tierspezies untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Demnach wurden dem Rattenskelettmuskel vergleichbare Aktivitäten nur im Mausskelettmuskel gefunden. Es schien deshalb am günstigsten, die Lipaseaktivität aus dem Rattenhinterbeinmuskel zu reinigen.

Tab. 5: Lipaseaktivität in Muskeln verschiedener Spezies

Tierspezies	s.A. (n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)	
Kaninchen	10,6	
Pute, Brust	1,2	
Pute, Schenkel	2,0	
Taube, Brust	6,7	
Schwein	2,4	
Ratte, Hinterbein	44,3	
	32,0	$\bar{x}$=34,0
	25,6	
Rind, Biceps	13,6	
Rind, Wangenmuskel	10,0	
Maus	26,3	
Huhn, Brust	1,2	
Huhn, Hinterbein	1,4	

Die verschiedenen Muskelproben wurden wie der Rattenhinterbeinmuskel aufgearbeitet und die lipolytische Aktivität im 14 000 g Überstand wie unter Meth. 2.2.2. aufgeführt bestimmt. Es wurden 0,2 ml 14 000 g Überstand ≙1 mg Protein pro Ansatz eingesetzt.

2. Präparation einer Lipase aus dem Skelettmuskel der Ratte

Nach Tötung durch Genickschlag wurden männlichen Ratten der Gewichtsklasse 200 - 300 g die Muskeln des Oberschenkels herausgeschnitten, von sichtbaren Fettanteilen befreit und bis zum Gebrauch in flüssiger Luft aufbewahrt. 700 g Muskel wurden in 100

g-Portionen im Starmix mit je 500 ml 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 10x 20 sek zerkleinert. Diese und alle folgenden Schritte wurden bei etwa 4°C ausgeführt. Das Homogenat (Lipase I, Test nach Zusatz von Triton X-100) wurde bei 1 000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag 2x mit je etwa 2,5 l 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 gewaschen. Die Waschwässer (1 000 g Überstände) wurden verworfen. Der gewaschene Niederschlag wurde mit wenig Puffer am Ultraturrax rehomogenisiert und mit 10 %iger Triton X-100-Lösung in 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 vermischt, sodaß eine Endkonzentration von 1 % vorlag. Es wurde 10 min mit Plümper gerührt und der Brei 45 min bei 100 000 g zentrifugiert. Der 100 000 g Überstand (Lipase II) wurde gesammelt und bei 4°C über Nacht oder über mehrere Tage bei -20°C aufbewahrt.

Aus dem 100 000 g Überstand wurde mit Bio Beads SM-2 Triton X-100 entfernt (vergl. Meth. 8). Das Ende des Rührvorganges wurde nach Triton X-100-Bestimmung festgelegt (vergl. Meth. 7). Die Bio Beads SM-2 wurden abfiltriert und nachgewaschen. Mit dem Triton X-100-armen Überstand (Lipase III) wurde eine $(NH_4)_2SO_4$-Fällung durchgeführt (0 - 40 % Sättigung). 15 min nach Zugabe des $(NH_4)_2SO_4$ wurde der Niederschlag hochtourig abzentrifugiert. Der flotierende Niederschlag wurde in 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 gelöst und gegen 20 l des gleichen Puffers über Nacht dialysiert (Lipase IV, Test nach Zusatz von Triton X-100). Auch an dieser Stelle konnte eingefroren werden.

In 4 Portionen wurde der dialysierte $(NH_4)_2SO_4$-Niederschlag mit jeweils 150 ml gewaschenem Alu-Gel-S (3x mit je 150 ml 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5) verrührt und bei 3 000 g abzentrifugiert. Der Alu-Gel-S-Niederschlag wurde so lange mit 100 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 100 mM NaCl gewaschen, bis kein Protein mehr eluiert wurde (4 - 5x mit jeweils 300 ml). Desorbiert wurde durch 15 min Rühren mit jeweils 150 ml 100 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 100 mM NaCl + 2 % Triton X-100. Die Lipase befand sich nach Zentrifugation bei 9 000 rpm im GS-3-Rotor im Überstand. Es wurde ein Volumen von 4 x 150 ml = 600 ml Lipase erhalten.

Aus dem lipasehaltigen Überstand wurde Triton X-100 mit Bio Beads SM-2 (0,3 g/ml) entfernt. Das Ende des Rührvorgangs wurde wieder nach Triton X-100-Bestimmung festgelegt. Die Bio Beads SM-2 wurden abfiltriert und nachgewaschen. Mit dem Triton X-100-armen Überstand wurde, wie oben beschrieben, eine $(NH_4)_2SO_4$-Fällung (0 - 40 % Sättigung) durchgeführt. Bis zu einer Endkonzentration von 1 % wurde dem in 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 aufgenommenen Niederschlag Triton X-100 zugesetzt. Der gelöste Niederschlag je einer Portion wurde 3 Stdn gegen 1 l 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 5 % Glycerin + 1 % Triton X-100 dialysiert. Nach je einer Stunde wurde der Puffer gewechselt. Es wurden 4 x 10,5 ml = 42 ml Lipase VI erhalten.

Je 2 ml der Lipase VI (≙ 20 mg Protein) wurden auf einen Triton X-100-haltigen Glyceringradienten aufgelegt und 16 Stdn bei 25 000 rpm bei 0 - 5°C im SW-27-Rotor zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde das Celluloseacetat-Röhrchen unten angestochen und in 2 ml Portionen ausgetropft (Abb. 9).

Der Triton X-100-haltige Glyceringradient wurde wie folgt hergestellt: 18,5 ml 5 %iges Glycerin + 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 1 % Triton X-100 wurden in den rechten Schenkel, 18,5 ml 20 %iges Glycerin + 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 1 % Triton X-100 in den linken Schenkel des Gradientenmischgerätes gefüllt und in ein Celluloseacetat-Röhrchen für den SW-27-Rotor ausgetropft.

Mit einer Ausbeute von 10,6 % wurde eine Anreicherung auf das 215-fache gegenüber dem Homogenat erreicht (Tab. 6). Der letzte Schritt der Anreicherung war ein Triton X-100-haltiger Glyceringradient (Abb. 9). Die Lipasefraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität (3 037,7 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min) befand sich bei 16 % Glycerin. Die Gesamtausbeute im Gradienten betrug 72,1 % der eingesetzten Aktivität.

Tab. 6: Anreicherung der Lipase aus 700 g Hinterbeinmuskel (Oberschenkel) der Ratte

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Gesamtprotein (mg)	s.A. (n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)	Gesamteinheiten (μMol FFS/60 min)	Anreicherungsfaktor	Ausbeute (%)
Homogenat (Lipase I)	4 250	26,205	111 371,3	13,0	1 447,8	1	100
100 000 g Überstand (Lipase II)	940	4,283	4 022,9	283,4	1 140,1	22	79
Triton X-100-armer 100 000 g Überstand (Lipase III)	1 000	3,687	3 687,3	278,1	1 025,4	21	71
$(NH_4)_2SO_4$-Niederschlag, 0 - 40 % Sättigung, dialysiert (Lipase IV)	346	8,386	2 901,6	298,2	865,2	23	60
erstes Eluat nach Alu-Gel-S-Adsorption (Lipase V)	600	1,087	652,2	929,7	606,4	72	42
$(NH_4)_2SO_4$-Niederschlag nach Alu-Gel-S-Adsorption, 0 - 40 % Sättigung, dialysiert (Lipase VI)	42	10,275	431,6	983,5	424,5	76	29
Glyceringradient[x] (Lipase VII)	84	0,654	54,9	2 795,7	153,5	215	11

[x] Fraktionen 14 und 15 vereinigt, vergl. Abb. 9

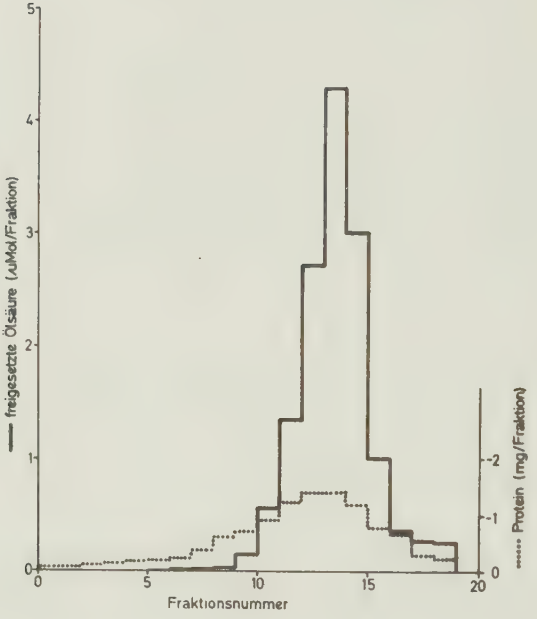


Abb. 9: Reinigung der Lipase im Triton X-100-haltigen Glycerin-gradienten
2 ml Lipase VI ≙ 20 mg Protein wurden auf den fertiggestellten Gradienten aufgelegt (Herstellung des Gradienten siehe oben). Es wurden je Fraktion 0,1 ml für den Lipasetest nach Meth. 2.2.2. eingesetzt.

Während der Lipaseanreicherung wurde Triton X-100 aus dem 100 000 g Überstand (Lipase II) und aus dem Eluat nach Alu-Gel-S-Adsorption (Lipase V) jeweils vor der $(NH_4)_2SO_4$-Fällung entfernt. Dieses gelangt sonst bei der $(NH_4)_2SO_4$-Fällung mit in den Niederschlag, und somit würde eine Triton X-100-Anreicherung in der Enzymlösung erfolgen. Im Lipasetest muß eine definierte

Triton X-100-Konzentration vorliegen (vergl. Abb. 5), sodaß die Kenntnis der Detergenzkonzentration in den einzelnen Zwischenstufen der Lipaseanreicherung notwendig ist. Aus den in Tabelle 7 angegebenen Werten für Triton X-100 vor und nach Behandlung mit Bio Beads SM-2 geht hervor, daß die Restgehalte nach Entfernung des Detergenzes zwischen 6,4 und 10 % der Ausgangskonzentrationen lagen.

Für die Bestimmung der Lipaseaktivitäten wurden die Triton X-100-Gehalte korrigiert und wie unter Methoden 2.2.2. beschrieben in allen Testansätzen eine Endkonzentration von 0,4 % verwendet.

Tab. 7: Triton X-100-Entfernung aus den verschiedenen Zwischenstufen der Lipaseanreicherung

Fraktion	Triton X-100-Konzentration (%)		Restgehalt an Triton X-100 in % der Ausgangskonzentration
	vor Behandlung mit Bio Beads SM-2	nach Behandlung mit Bio Beads SM-2	
100 000 g Überstand (Lipase II)	1,021	0,078	7,6
erstes Eluat nach Alu-Gel-S-Adsorption (Lipase V)	1,949	0,124	6,4
$(NH_4)_2SO_4$-Niederschlag nach Alu-Gel-S-Adsorption, 0 - 40 % Sättigung, dialysiert (Lipase VI)	2,030	0,162	8,0
Glyceringradient (Lipase VII)	1,053	0,105	10,0

Einzelheiten der Entfernung und Bestimmung von Triton X-100 sind unter Meth. 7 und 8 angegeben.

3. Charakterisierung und Eigenschaften der angereicherten Lipase

3.1. Testkriterien

Mit dem angereicherten Enzym (Lipase VII) wurde die Abhängigkeit

des Lipasetests 1. von der Zeit, 2. von der Proteinkonzentration, 3. vom p_H-Wert, 4. von der Substratkonzentration, 5. von der Triton X-100-Konzentration untersucht (vergl. Abb. 1 - 5).

Die angereicherte Lipase verhielt sich bezüglich dieser Eigenschaften wie das unreine solubilisierte Enzym mit Ausnahme von 2., wo die Abhängigkeit von der Proteinkonzentration einen leicht sigmoidalen Kurvenverlauf zeigte.

Vergleicht man die Proteinabhängigkeiten der letzten drei Anreicherungsstufen miteinander (Abb. 2, 10, 11), so verschiebt sich der Bereich des Steigungswechsels auf der Kurve mit höherer Reinheit zu geringeren Proteinwerten. Der Grund für den sigmoidalen Verlauf der Proteinabhängigkeiten ist nicht bekannt.

Eine Angabe von K_m erscheint für lipolytische Enzyme nicht sinnvoll (123).

3.2. Gehalt an Lipoproteinlipase

In den folgenden Versuchen wurde in den verschiedenen Lipasefraktionen auch die Aktivität der Lipoproteinlipase bestimmt. Lipoproteinlipase kann durch ihre Aktivierbarkeit mit Serum, sowie durch ihre Hemmbarkeit mit 1 M NaCl und Protaminsulfat von der Lipase unterschieden werden (vergl. Tab. 1, 8). Die von uns gefundenen Werte stimmen mit der Literatur überein (86). Außerdem benötigt das Enzym kein Triton X-100. Die Testbedingungen, die mit Postheparinplasma ausgearbeitet wurden, sind unter Methoden 4.2.2. beschrieben. Die Abhängigkeit des Lipoproteinlipasetests von der Proteinkonzentration wurde für das Muskelenzym mit der Fraktion Lipase IV gemessen und ergab eine Linearität bis 0,84 mg Protein pro Ansatz.

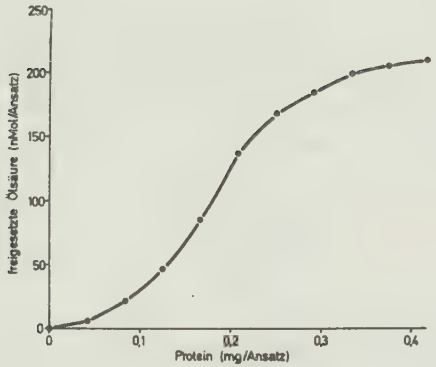


Abb. 10

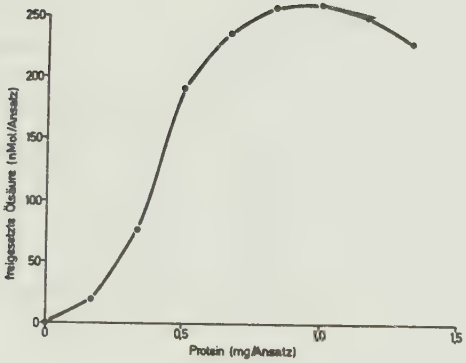


Abb. 11

Abb. 10, 11: Abhängigkeit des Lipasetests von der Proteinkonzentration

Inkubationsansatz: 0,1 ml Trioleinemulsion, 0,1 ml 300 mM Natriumphosphat-Puffer p_K 6,5, 0,1 ml 10 %iges dialysiertes Rinderserumalbumin, 0,1 ml 1 %iges Triton X-100, 0,1 ml Lipase (für Abb. 10: Lipase VI $\hat{=}$ 0,21 mg Protein, für Abb. 11: Lipase IV $\hat{=}$ 0,663 mg Protein). Durchführung des Tests nach Meth. 2.2.2.

Tab. 8: Charakteristik der Skelettmuskel-Lipoproteinlipase (Lipase IV)

Effektor	Konzentration im Inkubationsmedium	relative Aktivität (%)
-	-	100
ohne Serum	-	2,0
NaCl	1 M	37,6
Protaminsulfat	125 µg/ml	100
Protaminsulfat	750 µg/ml	45,6
Protaminsulfat	1 500 µg/ml	23,4

Der Lipoproteinlipasetest im Rattenskelettmuskel wurde wie unter Meth. 4.2.2. für das Postheparinplasma der Ratte beschrieben durchgeführt, jedoch unter Zusatz von 0,1 ml dialysiertem Humanserum pro Ansatz. Eine s.A. von 22,1 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.

Die Verteilung der Lipoproteinlipase war wie folgt: im Triton X-100-armen 100 000 g Überstand (Lipase III) wurden 3,1 % der Lipaseaktivität als Lipoproteinlipase gemessen, im $(NH_4)_2SO_4$-Niederschlag (Lipase IV) 7,4 %. In der Lipase VI lagen weniger als 0,4 % der Lipaseaktivität als Lipoproteinlipase vor. In den saubersten Fraktionen des Glyceringradienten (Lipase VII) war keine Lipoproteinlipaseaktivität mehr meßbar. Bei gleicher Anreicherung beider Lipasen im Glyceringradienten waren maximal 1 % der Lipase als Lipoproteinlipaseaktivität zu erwarten.

3.3. Stabilität der Lipase

Bei -20°C war die Lipase einige Wochen ohne Aktivitätsverlust haltbar, bei +4°C mehrere Tage.

Bei der Prüfung auf Hitzestabilität ohne und in Gegenwart von Substrat (Trioleinkonzentration während der Vorinkubation 4 mM) wurde deutlich, daß die Lipase ohne Substrat stabiler gegen Hitze ist als in Gegenwart von Substrat. Diese Beobachtung beruht nicht auf einer Hitzeinaktivierung der Trioleinemulsion.

Das zeigte ein Vergleich der Ausgangsaktivitäten mit nicht vorbehandelter Emulsion und 5 min bei 56°C vorinkubierter Emulsion. Der Unterschied zwischen einer Vorinkubation mit Substrat und einer Inkubation unter Testbedingungen liegt darin, daß bei der Vorinkubation Triton X-100 und Rinderserumalbumin fehlen. Möglicherweise verhindern diese Zusätze eine Anlagerung des Lipaseproteins an das Substrat und damit dessen Inaktivierung während der Testbedingungen.

Tab. 9: Hitzestabilität der Lipase VII

Enzymlösung (Lipase VII)	Vorinkubations- dauer (min)	temperatur (°C)	Vorinkubation + oder – Substrat	relative Aktivität (%)
Ausgangsaktivität	–	–	–	100
Ausgangsaktivität mit 5 min bei 56 °C vorinkubiertem Substrat	–	–	–	91,6
Vorinkubierte Aktivitäten:				
1a.	5	37	+	28,1
			–	101,7
1b.	15	37	+	22,3
			–	93,9
1c.	30	37	+	16,2
			–	76,7
2.	5	56	+	2,3
			–	20,0
3.	5	75	+	0
			–	0

Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. aufgeführt. Es wurden 0,1 ml Lipase VII ≙ 0,058 mg Protein pro Ansatz eingesetzt. Eine lipolytische Aktivität von 2 842 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.

Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C ohne Substrat waren noch 76,7 % der Ausgangsaktivität meßbar, vergleichbar dem in Tabelle 4 für den 14 000 g Überstand angegebenen Wert. Nach 5

min bei 56°C ohne Substrat waren nur noch 20 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Nach 5 min Vorinkubation bei 75°C ohne Substrat war das Enzym vollständig inaktiviert.

Stabilität der Lipase in Abwesenheit von Triton X-100 (Reaktivierungsversuch mit Triton X-100)

Wie bereits erwähnt, ist sowohl für die Extraktion, als auch für die Aktivität der Muskellipase Triton X-100 unerläßlich (vergl. Tab. 3, Abb. 5). Um zu prüfen, in welchem Maße Triton X-100 auch für die Stabilität des Enzyms verantwortlich ist, wurde die Fraktion Lipase VII durch Behandeln mit Bio Beads SM-2 weitgehend von Triton X-100 befreit und nachträglich zu verschiedenen Zeiten wieder mit Triton X-100 versetzt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 10.

Tab. 10: Effekt von Triton X-100 auf die Stabilität der Lipase

Aufbewahrungsdauer (Stdn)	Lipaseaktivität einer Triton X-100-armen Enzymlösung nach Stehen	
	1. mit Triton X-100 (%)	2. ohne Triton X-100 (%)
0	98,0	
6	94,6	98,1
24	85,3	83,5
48	78,5	82,5
120	-	58,3

Bei 4°C wurde in 2 Versuchsreihen einer durch Behandeln mit Bio Beads SM-2 an Triton X-100 verarmten Lipaselösung 1. Triton X-100 zur Zeit t = 0 Stdn zugesetzt und die Lipaseaktivität zu den angegebenen Zeiten bestimmt, 2. Triton X-100 erst jeweils nach den angegebenen Zeiten zugesetzt und sofort der Lipasetest durchgeführt. Die Testbedingungen waren wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,1 ml Lipase VII ≙ 0,059 mg Protein (für die Ausgangsaktivität) bzw. 0,1 ml Triton X-100-arme Lipase VII nach erneuter Zugabe von Triton X-100 ≙ 0,053 mg Protein pro Ansatz eingesetzt. Eine Ausgangsaktivität von 2 107 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.

Hieraus geht hervor, daß die Lipaseaktivität bis zu 48 Stdn praktisch dieselbe bleibt, gleich ob Triton X-100 von Anfang an zugegen war, oder erst nach dieser Zeit zugegeben wurde. Erst nach 120 Stdn Stehenlassen ohne Triton X-100 ging die Aktivität deutlich zurück. Dagegen behielt eine nicht mit Bio Beads SM-2 behandelte Enzymlösung über 120 Stdn ihre Aktivität bei.

3.4. Molekulargewichtsbestimmung an Sepharose 6B

Nach Eichung der Säule mit 4 Testsubstanzen wurde für die Lipase VI ein Molekulargewicht von etwa 1 Million ermittelt (Abb. 12). Der Gehalt der Lipase VI an enzymgebundenem Triton X-100 ist dabei nicht berücksichtigt. Eine Bestimmung des Restgehaltes an Triton X-100 war nicht möglich, da es sich nicht um eine homogene Proteinfraktion handelte. Das Elutionsprofil der Lipase VI ist in Abbildung 13 dargestellt.

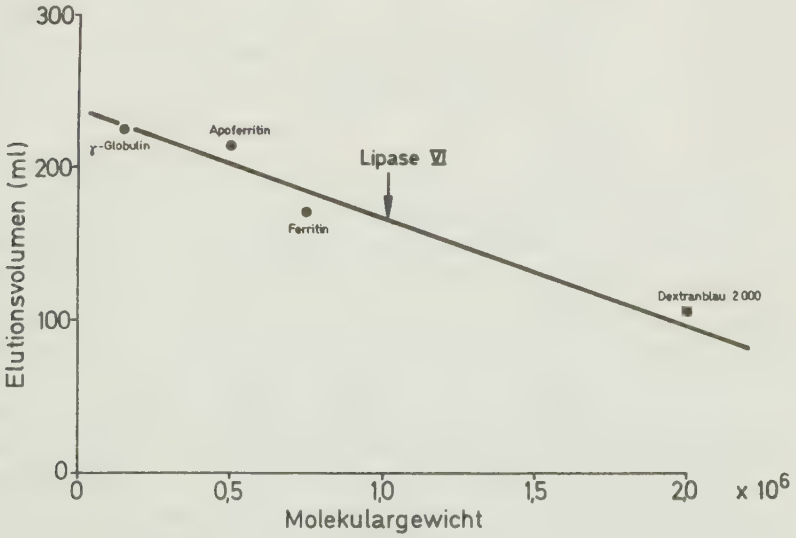


Abb. 12: Ermittlung des Molekulargewichts der Lipase
Versuchsbedingungen siehe Abb. 13.

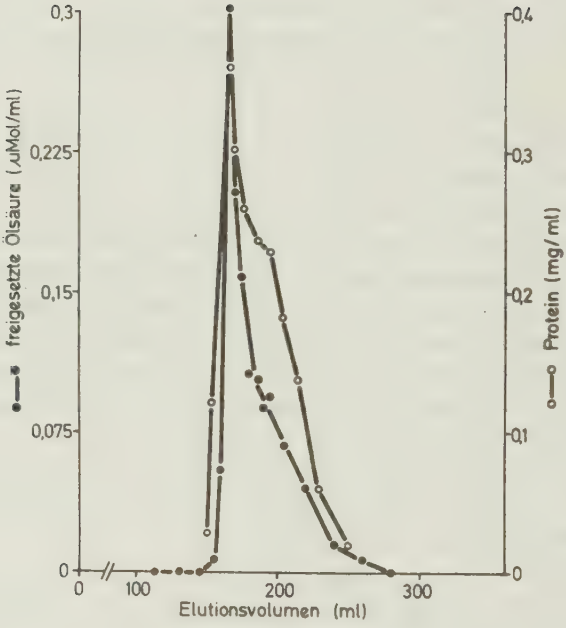


Abb. 13: Gelfiltration der Lipase VI an Sepharose 6B
1 ml Lipase VI ≙ 12 mg Protein der s.A. 750 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min wurde unter gleichen Bedingungen wie die Eichproteine filtriert und in den Eluaten die Lipaseaktivität nach Meth. 2.2.2. bestimmt.
Eichung der Säule: Eine 100 x 2 cm Säule wurde mit Sepharose 6B gefüllt und mit 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 1 % Triton X-100 äquilibriert. Von den Eichproteinen γ-Globulin, Apoferritin, Ferritin und Dextranblau 2 000 wurden je 1 ml (= 10 mg Protein in 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 1 % Triton X-100 gelöst) auf die Säule aufgetragen und mit dem gleichen Puffer mit einer Flußgeschwindigkeit von 15 ml/Std eluiert. Es wurden 5 ml Fraktionen gesammelt. Für jedes Protein wurde ein eigener Säulenlauf durchgeführt.

3.5. Inhibitoren der Lipase

Verschiedene Zusätze

Durch Zusätze zum Test wurde eine Reihe von Substanzen in ihrer Wirksamkeit auf die Lipase überprüft. Ein Teil der Inkubationen wurde in Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5, ein Teil in TRIS-HCl-Puffer p_H 7,0 vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11: Inhibitoren der Lipase (verschiedene Zusätze)

Zusätze	Konzentration im Inkubationsmedium (mM)	relative Aktivität (%)
1. Inkubationen in 60 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5		
Kontrolle	-	100[x]
NaF	2	42,5
	5	25,3
	10	13,4
	20	7,1
NaCl	10	93,0
	50	89,4
	100	58,7
	1 000	26,0
Na_2SO_4	50	97,7
NaN_3	50	85,4
$MgCl_2$	50	65,2
KCl	50	83,0
$CaCl_2$	50	77,1
EDTA	5	58,0
EGTA	5	100,6
DTE	2	74,0
Jodacetamid	2	93,2
NEM	2	85,7

[x] Eine s.A. von 2 649,3 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.

noch Tab. 11

Zusätze	Konzentration im Inkubationsmedium (mM)	relative Aktivität (%)
pHMB	2	69,0
Heparin	0,02 mg/ml	92,1
Protaminsulfat	0,75 mg/ml	95,0
2. Inkubationen in 60 mM TRIS-HCl-Puffer p_H 7,0		
Kontrolle	-	100[x]
EDTA	5	64,8
Mg-acetat	5	95,1
EDTA + Mg-acetat	je 5	51,4
Zn-acetat	0,1	77,5
	0,2	62,1
	1	2,4
	2	0
	5	0
EDTA + Zn-acetat	je 5	51,5
$ZnSO_4$	5	1,5
EDTA + $ZnSO_4$	je 5	24,2
DTE	2	76,2
pHMB	2	59,7
DTE + pHMB	je 2	70,6

[x] Eine s.A. von 2 296,1 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.

Die Testbedingungen waren für 1. wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben, für 2. wurde anstelle von 0,1 ml 300 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 0,1 ml 300 mM TRIS-HCl-Puffer p_H 7,0 verwendet. 0,1 ml Lipase VII ≙ 0,064 mg Protein und 0,1 ml Effektorlösung wurden pro Ansatz eingesetzt.

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, sind Na-Fluorid und Zn^{2+} starke Inhibitoren der Lipase. EDTA hemmt bei 5 mM in Na-Phosphat-Puffer um 42 %, in TRIS-HCl-Puffer um 35,2 %. Eine geringere

Hemmwirkung hatten pHMB und DTE bei 2 mM.

Als Lipoproteinlipase-Inhibitoren gelten 1 M NaCl und Protaminsulfat (vergl. Tab. 1, 8). 1 M NaCl hemmt die angereicherte Muskellipase zu 74 %, Protaminsulfat bei 0,75 mg/ml dagegen nicht.

Oleathemmung

Wie Abbildung 14 zeigt, wird die Lipase durch Oleat gehemmt. Die halbmaximale Hemmkonzentration liegt etwa bei 0,8 mM Oleat. Während der Inkubationszeit von 60 min werden durch die Enzymreaktion in dem dargestellten Versuch etwa 75 n Mol Oleat pro Ansatz gebildet, was einer Konzentration von 0,15 mM entspricht. Nach den Ergebnissen in Abbildung 14 tritt bei diesen Konzentrationen praktisch keine Enzymhemmung auf.

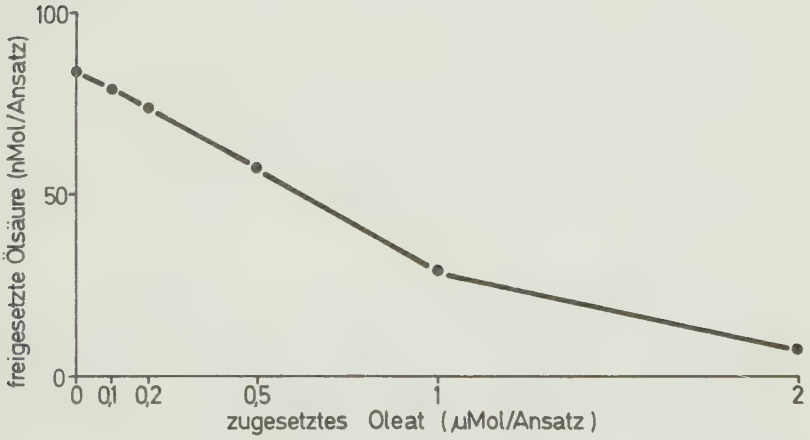


Abb. 14: Oleathemmung der Lipase
Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,1 ml Lipase VII ≙ 0,04 mg Protein und 0 - 0,1 ml 20 mM Ölsäure in 5 %iger Gummi arabicum-Lösung emulgiert pro Ansatz eingesetzt.

Im Lipasetest wurden mit und ohne Glycerinzusatz (bis zu 4 % Glycerin im Ansatz) gleiche Aktivitäten gemessen.

Hemmung der Lipase durch Humanserum

In Untersuchungen mit dem 100 000 g Überstand (Lipase II) wurde eine Hemmung der Muskellipase durch dialysiertes Rattenserum beobachtet (Abb. 15 a). Den gleichen Effekt bewirkte Humanserum. Die Untersuchung der Serumhemmung der angereicherten Lipase (Fraktion VII) wurde mit Humanserum durchgeführt, wobei sich eine ähnliche sigmoidale Hemmkurve wie bei Lipase II ergab (Abb. 15 b). Der 1000 g Überstand eines 5 min gekochten und 1 + 1 verdünnten Serums hemmte die Lipase nicht. Die Lipase wurde sowohl durch dialysiertes als auch nicht dialysiertes Serum inhibiert.

Die Lipaseaktivität des Humanserums selbst fällt bei diesen Versuchen nicht ins Gewicht. Sie beträgt bei Anwendung des Tests für die Muskellipase (in Gegenwart von 0,4 % Triton X-100) 0 - 1 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min gegenüber einer Aktivität der Muskellipase von 2 000 - 3 000 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min. Der Triglyceridgehalt des Serums beträgt bis 200 mg %, d.h. ~10 % an Substrat werden maximal zusätzlich in den Test eingeführt. Die Verminderung der Lipaseaktivität durch Serumzusatz zum Test kann folglich nicht durch Isotopenverdünnung erklärt werden. Ebenso kann die Hemmung nicht durch den Gehalt des Serums an freien Fettsäuren erklärt werden.

In einem weiteren Versuch wurde Serum mit $(NH_4)_2SO_4$ fraktioniert und die Fraktionen auf ihre Hemmwirkung getestet. Wie Tabelle 12 zeigt, besitzt die Fraktion 0 - 50 % Sättigung relativ größere Wirkung als die Fraktion 50 - 100 % Sättigung $(NH_4)_2SO_4$. Der dialysierte Überstand der $(NH_4)_2SO_4$-Fällung hatte praktisch keine Hemmwirkung. γ-Globulin vom Rind inhibierte 50 %. Die Hemmwirkung des Serums kann deshalb in der γ-Globulinfraktion vermutet werden. Mit $(NH_4)_2SO_4$ fällt dieses Protein bei 1,39 M = 33 % Sättigung (124).

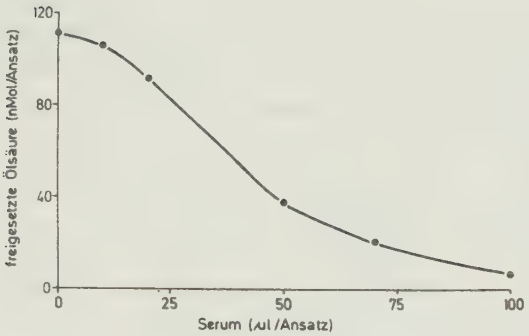


Abb. 15 a: Hemmung der Lipase II durch dialysiertes Rattenserum Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,1 ml Lipase II ≙ 0,478 mg Protein und jeweils unterschiedliche Mengen an dialysiertem Rattenserum, wie angegeben, in den Test eingesetzt.

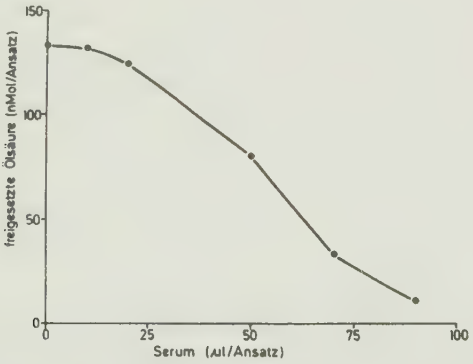


Abb. 15 b: Hemmung der Lipase VII durch dialysiertes Humanserum Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,1 ml Lipase VII ≙ 0,043 mg Protein und jeweils unterschiedliche Mengen an dialysiertem Humanserum, wie angegeben, in den Test eingesetzt.

Tab. 12: Hemmung der Muskellipase durch Humanserum

Fraktion	Zusätze (je 0,1 ml)	zugesetzte Proteinmenge (mg/Ansatz)	relative Aktivität (%)
Lipase VII	-	-	100
Serum-Kontrolle	-	-	<1
Lipase VII	Humanserum	6,4	1,1
Lipase VII	Humanserum, dialysiert	5,6	2,3
Lipase VII	$(NH_4)_2SO_4$-Fraktion I, dialysiert	6,4	5,5
Lipase VII	$(NH_4)_2SO_4$-Fraktion II, dialysiert	6,2	25,4
Lipase VII	$(NH_4)_2SO_4$-Überstand, dialysiert	-	92,7
Lipase VII	γ-Globulin vom Rind	6,0	53,5

Testbedingungen wie unter Meth.2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,1 ml Lipase VII ≙ 0,054 mg Protein pro Ansatz eingesetzt. Eine lipolytische Aktivität von 2 587,3 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.
Herstellung der $(NH_4)_2SO_4$-Fraktionen: Die $(NH_4)_2SO_4$-Fällung wurde mit 10 ml Humanserum durchgeführt. Die beiden Fraktionen I (0 - 50) und II (50 - 100) % Sättigung (aufgenommen in 0,9 %iger NaCl-Lösung) und der Überstand der Fällung wurden gegen 2 l 0,9 %ige NaCl-Lösung dialysiert, wobei 2x nach je 2 Stdn Dialyse die NaCl-Lösung gewechselt wurde. Es wurden etwa 5 ml je Fraktion I und II erhalten.

3.6. Wirkung von Polyaminen

Nach Jesmok et al. (68) erhöht Protaminsulfat bei 0,1 mM, Spermin und Spermidin in Konzentrationen von 0,1 - 10 mM die Lipaseaktivität aus dem Rattenherzen. In eigenen Versuchen bewirkten Protaminsulfat bei 0,1 mM im Ansatz (= 0,5 mg/ml), sowie Spermin, Spermidin und Putrescin bei Konzentrationen von 0,1 - 10 mM im Ansatz weder eine Hemmung noch eine Aktivierung des Enzyms.

3.7. Ersatz von Triton X-100 im Lipasetest durch Phospholipide

Auf der Suche nach weiteren Substanzen, die anstelle von Triton X-100 im Lipasetest eingesetzt werden könnten, gelangten Lysolecithin, Lecithin, Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin zur Anwendung. Wie die Ergebnisse unserer Untersuchungen in Tabelle 13 zeigen, kann keine der genannten Verbindungen Triton X-100 ersetzen.

Tab. 13: Ersatz von Triton X-100 im Lipasetest durch Phospholipide

Test-Nr.	Fraktion	Effektor, Endkonzentration im Test		relative Aktivität (%)
1.	Lipase VII	Triton X-100	1 %	100
2.	Lipase VII, Triton X-100-arm	-		11,5
3 a.	Lipase VII, Triton X-100-arm	Triton X-100	1 %	91,2
3 b.	Lipase VII, Triton X-100-arm	Lysolecithin	0,02 mM	12,9
			0,1 mM	10,8
			0,5 mM	10,7
			1,0 mM	11,2
			2,0 mM	4,0
			5,0 mM	1,6
3 c.	Lipase VII, Triton X-100-arm	Lecithin	0,02 mM	13,8
			0,1 mM	11,2
			0,5 mM	11,0
			1,0 mM	12,4
			2,0 mM	11,4
			5,0 mM	11,5
3 d.	Lipase VII, Triton X-100-arm	Phosphatidyl-inosit	0,02 mM	10,9
			0,1 mM	11,0
			0,5 mM	11,3
			1,0 mM	11,1
			2,0 mM	8,5
			5,0 mM	6,2
3 e.	Lipase VII, Triton X-100-arm	Phosphatidyl-serin	0,02 mM	10,6
			0,1 mM	13,0
			0,5 mM	12,9
			1,0 mM	14,5
			2,0 mM	11,2
			5,0 mM	7,1

Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 1. 0,1 ml Lipase VII, 2. 0,1 ml Lipase VII, Triton X-100-arm

(Test ohne Triton X-100), 3a. 0,1 ml Lipase VII, Triton X-100-arm + 1 % Triton X-100, 3b. - 3e. 0,1 ml Lipase VII, Triton X-100-arm + unterschiedliche Phospholipidmengen eingesetzt. Der Enzymeinsatz betrug pro Testansatz 0,063 mg Protein. Eine s.A. von 2 373 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.

3.3. Substratspezifität

Zur Prüfung der Substratspezifität wurden die in Tabelle 14 angegebenen Verbindungen eingesetzt.

Setzt man die Spaltungsgeschwindigkeit von Triolein gleicht 100 %, so beträgt die Aktivität gegenüber Cholesteryloleat 5,7 %, gegenüber Oleoyl-CoA 25 %, während Acetyl-CoA überhaupt nicht hydrolysiert wird.

Tab. 14: Spaltung verschiedener Substrate durch Muskellipase

Substrat	Anzahl der Versuche	Aktivität (%)	s.A. (n Mol FFS bzw. CoA-SH/mg Prot. x 60 min)
Triolein	3	100	2 963,3
Cholesteryloleat	2	5,7	167,5
Oleoyl-CoA	2	25,0	740,0
Acetyl-CoA	2	0	0

Lipase- und Cholesteryloleat-Hydrolaseaktivität wurden, wie unter Meth. 2.2.2. und 9. beschrieben, durch einen radioaktiven Test bestimmt. Dabei wurden für jeden Versuch 0,05 und 0,1 ml Lipase VII ≙0,025 - 0,03 und 0,05 - 0,06 mg Protein pro Ansatz eingesetzt. Der Test für die Oleoyl-CoA- und Acetyl-CoA- Hydrolaseaktivität wurde nach Meth. 10. durch Messung des freigesetzten CoA-SH mit α-Ketoglutarat-Dehydrogenase durchgeführt. Dabei wurden für jeden Versuch 0,01 und 0,02 ml Lipase VII ≙0,005 - 0,006 mg Protein und 0,01- 0,012 mg Protein verwendet. Alle eingesetzten Substrate lagen in einer Endkonzentration von 4 mM im Test vor. Die Aktivitäten sind als Mittelwerte der jeweils durchgeführten Versuche angegeben.

3.9. Stöchiometrie der Lipasereaktion

Um das Verhältnis der Reaktionsprodukte der Lipase zu bestimmen, wurde in getrennten Ansätzen 1. in der Fettsäure ^{14}C-markiertes Triolein verwendet und die Fettsäurefreisetzung bestimmt, 2. im Glycerin ^{3}H-markiertes Triolein verwendet und die Glycerinfreisetzung bestimmt. Entsprechende Kontrollen wurden mit Rhizopus arrhizus-Lipase + Esterase aus der Schweineleber durchgeführt, bei welcher der Fettsäure: Glycerin-Quotient bei 3:1 liegen soll. Wie aus Tabelle 15 ersichtlich, fanden wir einen Wert von 2,8:1. Für die Muskellipase ermittelten wir einen Quotienten von 8,6:1 als Mittel aus 4 Versuchen mit zwei verschiedenen Lipasepräparationen.

Tab. 15: Fettsäure: Glycerin-Quotient für Muskellipase und Rhizopus arrhizus-Lipase + Esterase aus Schweineleber

Enzym	lipolytische Aktivität (n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)		(n Mol Glycerin/mg Prot. x 60 min)		Fettsäure:Glycerin-Quotient	
Muskellipase:						
1. Versuch	2 782,7		296,4		9,4	
2. Versuch	2 841,0		311,6		9,1	
3. Versuch	3 262,5	$\bar{x}$=2732,2	404,2	$\bar{x}$=318,0	8,1	$\bar{x}$=8,6
4. Versuch	2 042,4		259,8		7,9	
Rhizopus arrhizus-Lipase + Esterase aus Schweineleber:						
1. Versuch	32 270		11 363		2,8	
2. Versuch	32 530	$\bar{x}$=32 400	11 786	$\bar{x}$=11 575	2,8	$\bar{x}$=2,8

Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. und 3.2. beschrieben. Für die Versuche mit Muskellipase wurden jeweils 0,05 und 0,1 ml Lipase VII pro Ansatz $\hat{=}$ 0,025 - 0,03 und 0,05 - 0,06 mg Protein eingesetzt. In den Versuchen mit Rhizopus arrhizus-Lipase + Esterase aus Schweineleber wurden zum Inkubationsansatz, der dem Reagenzienleerwert nach Meth. 2.2.2. und 3.2. entsprach, 0,01 ml eines 1:10 verdünnten Gemisches der beiden Enzyme $\hat{=}$ 0,01 mg Protein zugesetzt.

3.10. Spaltprodukte des Trioleins

Nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung wurden von etwa 0,05 mg Lipase VII in 60 min 3,9 % der in den Test eingesetzten Trioleinmenge (≙ 78 n Mol) gespalten. Davon wurden etwa 10 % (≙ 7,8 n Mol) als Diolein, 12 % (≙ 9,4 n Mol) als Monoolein und 60 % (≙ 46,8 n Mol) als Fettsäuren gefunden (Mittelwert aus 2 Versuchen, Tab. 16).

Tab. 16: Spaltprodukte des Trioleins durch Muskellipase

Spaltprodukte	Anteil des Spaltproduktes (%)
Diolein	10
Monoolein	12
Fettsäure	60

Die gespaltene Trioleinmenge beträgt 100 %.
Glyceryl tri(1-^{14}C)oleat wurde ohne und mit 0,1 ml Lipase VII (≈0,05 mg Protein) 60 min wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben inkubiert und aufgearbeitet. 0,5 ml der oberen (wäßrigen) bzw. der unteren (organischen) Phase wurden im Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 0,1 ml Chloroform-Methanol 2:1 aufgenommen (125). Je 10 µl dieser Lösungen wurden auf einer Dünnschicht-Kieselgel G-Fertigplatte mit einem Gemisch von Petroläther (Siedepunkt: 60 – 70°C)-Äther-Eisessig 90:10:1 als Laufmittel getrennt. Die Laufzeit betrug etwa 70 min. Der Nachweis der Lipidflecken geschah durch Einhängen der Platte in eine Trennkammer, die Jod enthielt. Als Referenzsubstanzen wurden je 20 µg Triolein, Diolein, Monoolein und Ölsäure gelöst in Chloroform-Methanol 2:1 auf die Platte aufgetragen.

3.11. Elektrophoretische Untersuchungen der Muskellipase (Polyacrylamidgel-Elektrophorese)

3.11.1. Triton X-100-haltige Gele und Gele ohne Triton X-100

Nach Vorversuchen mit 10, 7 und 4 %igen Gelen wurde das 4 %ige Gel ausgewählt, da erst bei dieser geringen Polyacrylamidgel-

Konzentration das Protein vollständig in das Gel wanderte. Die Abbildung 16a zeigt, lieferte die Lipase VII zwei Banden.

Bei Elektrophorese einer Triton X-100-armen Enzymprobe wanderte nur ein geringer Anteil (drei schwache Banden) des Proteins in das Gel hinein, die Hauptmenge blieb auf dem Gel liegen (Abb. 16b).

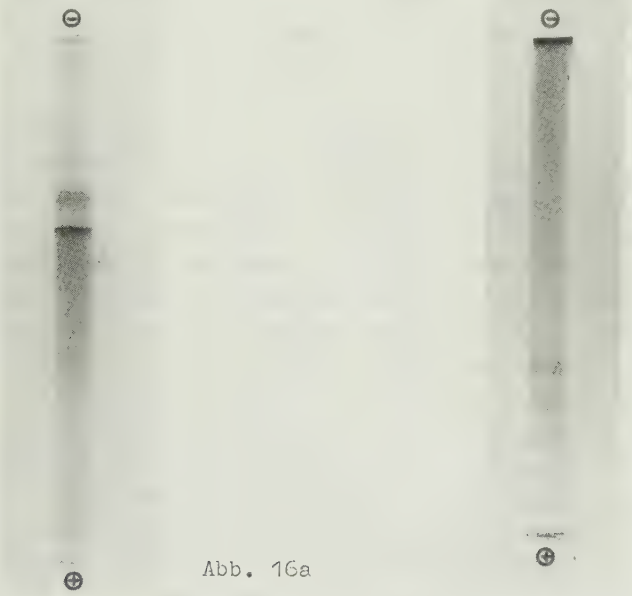


Abb. 16a Abb. 16b

Abb. 16a: Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Lipase VII in Anwesenheit von Triton X-100

Wir modifizierten die Methode von Dewald et al. (109), indem wir dem Gel und Kathodenpuffer 0,1 % Triton X-100 zusetzten. Die aufgetragene Enzymprobe enthielt 1 % Triton X-100 und Bromphenolblau als Indikator für das Ende des Elektrophoreselaufes. Die Gele wurden nach Meth. 11.2. hergestellt, je 15 µg Lipase VII auf ein Gel aufgetragen und die Elektrophorese 4 - 5 Stdn im Kühlraum bei 2 - 3 mA/Gel durchgeführt. Die Temperatur während des Laufes betrug über den Gelen 10 - 12°C. Als Kathodenpuffer (obere Kammer) wurde Lösung 4 + 0,1 % Triton X-100 verwendet, als Anodenpuffer (untere Kammer) Lösung 4 (siehe Meth. 11.). Das Anfärben der Gele erfolgte mit Coomassie Blau R 250 (108). Die schwache Bande an der Anode stellt die Lösungsmittelfront dar.

Abb. 16b: Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Lipase VII in Abwesenheit von Triton X-100
Die Gele wurden nach Meth. 11.1. hergestellt und je 15 µg Lipase VII, aus der Triton X-100 entfernt worden war (wie unter Meth. 8. beschrieben), aufgetragen. Es galten die gleichen Elektrophoresebedingungen wie für Abb. 16a., jedoch enthielt der Kathodenpuffer kein Triton X-100.

3.11.2. Versuch der Lokalisation der Lipase im Gel: direkter Nachweis der Lipaseaktivität im trioleinhaltigen Gel

Nach Lakshmi et al. (110) kann Lipaseaktivität nach Auftrennung in substrathaltigen Polyacrylamidgelen durch Anfärben der freigesetzten Fettsäuren mit Nilblau A nachgewiesen werden. Bei Anwendung dieser Methode auf die gereinigte Muskellipase erschien das Enzym als blaue Bande gegenüber einem rosa Hintergrund (Abb. 17, Schwarz-Weiß-Foto). In einem Parallelgel wurde eine Proteinfärbung mit Coomassie Blau R 250 durchgeführt. Leider wurde hier - wohl bedingt durch den Trioleingehalt des Gels - nur ein diffu-

Abb. 17: Nachweis der Lipasereaktion im Gel
Die von uns verwendeten Gele wurden wie unter Meth. 11.3. beschrieben hergestellt. Je 100 µg Lipase VII wurden auf ein Gel aufgetragen. Es galten die gleichen Elektrophoresebedingungen wie für Abb. 16a. Die Elektrophoresedauer jedoch wurde hier auf 5 - 6 Stdn heraufgesetzt. Nach Entfernung der Triolein- und Triton X-100-haltigen Gele aus dem Elektrophorese-Röhrchen wurden diese 10 min bei 37°C in 100 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 inkubiert, um den p_H-Wert von >8 in Richtung p_H-Optimum der Lipasereaktion (=6,5) zu verschieben. Die Gele wurden weitere 3 Stdn bei 37°C auf einem Objektträger in einer geschlossenen Petrischale inkubiert, die mit einem mit 100 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 angefeuchteten Filterpapier ausgelegt war. Dabei findet die Enzymreaktion mit dem Triolein an der Stelle des Lipase-Proteins statt. Die freigesetzten Fettsäuren wurden anschließend mit Nilblau A angefärbt (110).

ser Proteinfleck erhalten, sodaß eine Zuordnung der Lipaseaktivität zu einer bestimmten Proteinbande mit dieser Methode nicht möglich war. Es wurde deshalb versucht, nach Lakshmi et al. (110) und Verine et al. (126) Lipaseaktivität vom Polyacrylamidgel zu eluieren und damit die Lage der Enzymbande auf dem Gel zu bestimmen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 18. Wie man sieht, ist die Lipaseaktivität in der ersten der beiden Banden lokalisiert.

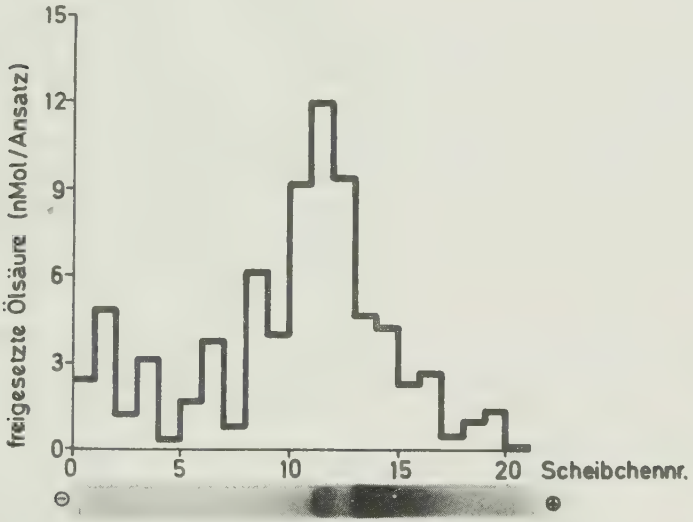


Abb. 18: Aktivitätsprofil der Muskellipase nach Elution vom Polyacrylamidgel

50 µg Lipase VII wurden in einem Triton X-100-haltigen Gel, hergestellt wie bei Meth. 11.2. beschrieben, der Elektrophorese unterworfen. Es galten die Bedingungen des Laufes für Abb. 16a, jedoch wurde der Enzymprobe kein Bromphenolblau zugesetzt und die Elektrophoresedauer auf 5 - 6 Stdn heraufgesetzt. Das Gel (Länge 8,4 cm) wurde in 21 Scheibchen je 0,4 cm geschnitten und jedes dieser Stücke auf Lipaseaktivität untersucht. Dafür wurde jedes Gelscheibchen zerkleinert und im Reagenzienleerwert wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben, jedoch mit 180 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 120 min inkubiert. Die Aufarbeitung der Testansätze erfolgte wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Durch die Gelbestandteile wurde eine Lipaseaktivität bekannter Größe auf etwa 50 % reduziert.

II. Untersuchungen zur Regulation der Muskellipase

1. Ganztierversuche

1.1. Mit verschiedenen Diäten ernährte und gehungerte Ratten

Nach Literaturberichten wird die Lipoproteinlipaseaktivität im Muskel im Hunger gesteigert (78) - (80). Da für die Lipase keine entsprechenden Daten vorliegen, wurde der Einfluß von Hunger und verschiedenen Diäten auf die Lipaseaktivität des Rattenskelettmuskels untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengestellt. Demnach lag die Lipaseaktivität bei den 48 Stdn Hungertieren gegenüber normal gefütterten Tieren signifikant niedriger, und zwar unabhängig davon, ob das Muskelfrischgewicht, oder das extrahierbare Protein als Bezugsgröße eingesetzt wurde. Wiederfütterung der Hungerratten mit Fett, Eiweiß oder Kohlenhydraten führte nicht zu einer Normalisierung der Aktivität. Fettfütterung schien sogar noch zu einem weiteren Absinken der Lipase zu führen.

Tab. 17: Lipaseaktivität im 100 000 g Überstand des Skelettmuskels unterschiedlich ernährter und gehungerter Ratten

Kollektiv	relative Aktivität (%)	Lipaseaktivität (n Mol FFS/g Muskel x 60 min)	(n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)
Kontrolle	100	9 169,7 ± 1 244,9	123,7 ± 18,4
Hunger	78,6	7 209,7 ± 1 048,7*	89,8 ± 4,6*
Speck	65	5 957,4 ± 438,7*	80,7 ± 7,3*
Eiweiß	81,7	7 490,9 ± 1 120,9*	105,7 ± 16,8
Zwieback	69,2	6 343,7 ± 1 218,4*	90,3 ± 18,4*

In 3 Versuchen wurden die Ratten wie unter Meth. 12.1.1. beschrieben vorbehandelt. Nach Meth. 12.1.4. erfolgte die Entnahme und Aufarbeitung der Muskelproben. Es galten die Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,1 ml 100 000 g Überstand ≙ 0,45 - 0,6 mg Protein pro Ansatz eingesetzt.
In der Tab. sind die Mittelwerte für n = 6 $\bar{x}$ ± Standardabweichung angegeben. Bei den mit *bezeichneten Werten sind die Unterschiede statistisch signifikant gegenüber der normal ernährten Kontrolle (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$).

um auszuschließen, daß mit den 100 000 g Überständen unterschiedliche Mengen an unmarkierten Triglyceriden eingeschleppt werden, die infolge Isotopenverdünnung eine Abnahme der lipolytischen Aktivität vortäuschen könnten, wurden die Triglyceridgehalte der verschiedenen 100 000 g Überstände gemessen. Wie Tabelle 18 zeigt, liegen sie bei den Speck-gefütterten Tieren deutlich (um ca. 60 %) und bei den Hungertieren leicht (um ca. 14 %) höher gegenüber dem Mittelwert der übrigen Gruppen.

Tab. 18: Gehalt an Triglyceriden im 100 000 g Überstand

Kollektiv	Triglycerid (nMol/ml 100 000 g Überstand)
Kontrolle	634,7 ± 199,0
Hunger	711,5 ± 197,5
Speck	989,2 ± 229,3
Eiweiß	543,7 ± 180,6
Zwieback	599,8 ± 132,6

Die Bestimmung der Triglyceride erfolgte wie unter Meth. 13. beschrieben.
In der Tab. sind die Mittelwerte für n = 6 $\bar{x}$ ± Standardabweichung angegeben.

In den Lipase-Inkubationsansatz werden 2 µMol Triolein eingesetzt. Aus den Daten der Tabelle 18 ergibt sich, daß durch den 100 000 g Überstand der Normaltiere zusätzlich im Mittel 0,124 µMol Triolein, bei den mit Speck ernährten Tieren 0,196 µMol in den Testansatz gelangen. Diese zusätzlichen 3,5 % an Triolein im Inkubationsansatz können den Abfall der Lipaseaktivität also nicht erklären.

.2. Alloxandiabetische Ratten

Da über Lipaseaktivitäten im Muskel diabetischer Tiere in der Literatur keine Angaben vorliegen, untersuchten wir den Einfluß von experimentell erzeugtem Diabetes auf die Lipaseaktivität des Rattenhinterbeinmuskels. Die Lipaseaktivitäten bei diabetischen

ratten zeigt Tabelle 19. Obwohl bei den dekompensierten diabetischen Tieren eine Tendenz zu erhöhten Werten zu erkennen ist, sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$).

Tab. 19: Lipaseaktivitäten im 100 000 g Überstand diabetischer Ratten

Kollektiv	Glucose im Blut (mg %)	Triglycerid (n Mol/ml 100 000 g Überstand)	relative Aktivität (%)	s.A. (n Mol FFS /g Muskel x 60 min)	s.A. (n Mol FFS /mg Prot. x 60 min)
Kontrolle (n = 6)	100 ± 8,4	634,7 ± 199,0	100	9 169,7 ± 1 244,9	123,7 ± 18,4
Diabetes, kompensiert (n = 10)	45,8 ± 16,2	573,5 ± 131,3	118,4	10 860,1 ± 2 303,0	124,5 ± 14,4
Diabetes, dekompensiert (n = 10)	645,5 ± 90,9	694,0 ± 159,5	138,5	12 698,6 ± 1 856,0	141,4 ± 22,6

Die Tiere wurden wie unter Meth. 12.1.2. beschrieben behandelt und nach Meth. 12.1.4. die Muskelproben entnommen und aufgearbeitet. Die Testbedingungen für die Lipase sind unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,1 ml 100 000 g Überstand ≙0,45 - 0,6 mg Protein pro Lipasetest eingesetzt. Die Triglyceridbestimmung erfolgte nach Meth. 13. und die Glucosebestimmung nach Meth. 14.
In der Tab. sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm$ Standardabweichung angegeben.

1.3. Versuche der Lipaseaktivierung durch Isoproterenol, in vivo

Nach Perfusionsexperimenten des isolierten Hinterbeins der Ratte stimuliert Isoproterenol (0,000 1 mM) in Gegenwart von 10 mM Glucose die Lipolyse (95). Dabei stiegen die cAMP-Spiegel im Gewebe

innerhalb von 2 - 5 min auf etwa das 2-fache an, während ohne Isoproterenol ein Abfall im cAMP-Gehalt des Muskels zu beobachten war. Aufgrund dieses Ergebnisses lag es nahe, nachzuprüfen, ob mit der erhöhten Glycerin- und Fettsäurefreisetzung des Muskels durch den ß-Rezeptorenstimulator Isoproterenol eine Steigerung der Lipaseaktivität in diesem Gewebe verbunden ist. Nach Vavřinková (persönliche Mitteilung und(127)) bewirkt eine i.p. Gabe von Adrenalin in Ratten eine signifikante Steigerung der Herzlipaseaktivität im Vergleich zur mit Propranolol behandelten Kontrolle, jedoch nicht im Vergleich zum NaCl-behandelten Tier. Deshalb wurden Ratten mit Isoproterenol bzw. dem ß-Rezeptorenblocker Propranolol behandelt. Eine Kontrollgruppe erhielt nur 0,9 %ige NaCl-Lösung.

Tab. 20: Lipaseaktivität im Rattenmuskel nach Isoproterenol- bzw. Propranololbehandlung

Versuchs-Nr.	Muskelentnahme nach Injektion (min)	Narkosebedingung	Lipaseaktivität (n Mol FFS/mg Prot. x 60 min) 1. Kollektiv NaCl	2. Kollektiv Isoproterenol	3. Kollektiv Propranolol
1	20	Äther	26,3	22,1	22,3
2	10	Äther	25,5	19,0	22,2
3	10	Nembutal	29,8	21,4	29,9

Einzelheiten der Behandlung der Tiere und der Gewinnung der Muskelproben für die Lipasebestimmung sind in Meth. 12.1.3. und 12.1.4. beschrieben. Für die Lipasebestimmung galten die Testbedingungen wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,2 ml 100 000 g Überstand ≙0,9 - 1,0 mg Protein pro Ansatz verwendet. In der Tab. sind die Mittelwerte $\bar{x}$ von n = 2 für jedes Kollektiv angegeben.

Nach den Ergebnissen der Tabelle 20 wurde kein Anstieg der Lipaseaktivität nach Isoproterenol gefunden. Ebenso blieb die Enzymaktivität unverändert nach ß-Rezeptorenblockade mit Propranolol. In den dargestellten Versuchen am Ganztier könnte eventuell wegen der Komplexität des Systems eine Lipaseaktivierung maskiert

sein. Es wurde deshalb auf in vitro Versuche mit isoliertem Rattendiaphragma und verschiedenen Lipasepräparationen aus Muskel übergegangen.

2. In vitro Versuche

2.1. Versuche am isolierten Rattendiaphragma

Am isolierten Rattenzwerchfell wird die Lipolyse durch Adrenalinzusatz gesteigert (128). In eigenen Versuchen mit Diaphragmen gefütterter Tiere verwendeten wir Isoproterenol. Es ergab sich eine lineare Abhängigkeit der Glycerinfreisetzung von der Isoproterenolkonzentration im Konzentrationsbereich von 0,000 1 mM - 1 mM (Abb. 19).

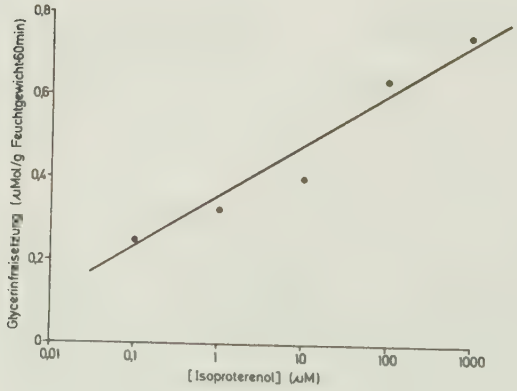


Abb. 19: Dosis-Wirkungskurve der Glycerinbildung des Rattendiaphragmas durch Isoproterenol
Versuchsbedingungen wie unter Meth. 12.2. beschrieben. Die Glycerinbestimmung wurde nach Eggstein et al. (118) durchgeführt (vergl. Meth. 13.).

In den folgenden Versuchen wurden Rattendiaphragmen mit Isoproterenol inkubiert und sowohl die Glycerinproduktion, als auch die Aktivität der extrahierbaren Lipase gemessen. Wie aus Tabelle 21 hervorgeht, blieb die Enzymaktivität unverändert, während die Glycerinbildung in Anwesenheit von Isoproterenol um mehr als das Doppelte erhöht war.

Tab. 21: Versuch zur Stimulierung der Lipolyse im Rattendiaphragma mit Isoproterenol

Kollektiv	Glycerinfreisetzung ins Inkubationsmedium (n Mol/g Feuchtgewicht x 60 min)	lipolytische Aktivität (n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)
Kontrolle	351	29,4
Isoproterenol	809	26,2

Die Rattendiaphragmen wurden wie unter Meth. 12.2. beschrieben präpariert, inkubiert und aufgearbeitet. Die Testbedingungen für die Lipase waren wie unter Meth. 2.2.2. beschrieben. Es wurden 0,2 ml 14 000 g Überstand $\hat{=}$1,0 mg Protein pro Ansatz eingesetzt. Die Glycerinbestimmung im Inkubationsmedium erfolgte nach Eggstein et al. (118) (vergl. Meth. 13.).
In der Tab. sind die Mittelwerte $\bar{x}$ von n = 3 angegeben.

Es gelang somit weder in Versuchen am Ganztier, noch am isolierten Zwerchfell durch ß-Rezeptoren-Stimulation eine Steigerung der Lipaseaktivität nachzuweisen. Möglicherweise wird während der Aufarbeitung des Gewebes eine aktivierte Lipase wieder soweit inaktiviert, daß kein Effekt wahrgenommen wird. Umgekehrt könnte es bei der Extraktion des Muskels mit Triton X-100 auch zu einer weitgehenden unspezifischen Aktivierung des Enzyms kommen. Deshalb wurde versucht, die Lipase nach Extraktion aus dem Muskel durch Behandlung mit ATP, Mg^{2+}, cAMP und Proteinkinase zu aktivieren, ähnlich, wie dies für die Lipase aus Fettgewebe beschrieben wurde (11) - (14). Ebenfalls wurde nach Tsai et al. (112) und Khoo et al. (16) die Inaktivierbarkeit der Lipase untersucht.

2.2. Versuche zur Lipaseaktivierung in löslichen Systemen

2.2.1. Mit endogener Proteinkinase

Es sollte zunächst geklärt werden, ob die Annahme einer weitgehenden Aktivierung der Muskellipase durch die Extraktion mit Triton X-100 zutreffen könnte. Bei Inkubation mit Aktivierungsmischung nach Methoden 12.3.1. wäre dann kein Effekt mehr nachweisbar. Tsai et al. (112) und Khoo et al. (16) fanden eine Inaktivierung der Fettgewebslipase durch Dialyse bei 4°C. Wir wendeten diese Methode auf die Muskellipase an und überprüften, ob eine 5stündige Dialyse eines 100 000 g Überstandes bei 4°C gegen 10 ml. Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 zu einer Abnahme der lipolytischen Aktivität führte. Zur Kontrolle blieb eine Probe während dieses Zeitraumes bei 4°C stehen. Als Ergebnis fanden wir, daß die Aktivität der dialysierten Probe noch ca. 70 % der bei 4°C stehen gelassenen betrug.(siehe Tab. 22, Kontrolle 0 min). Daraufhin wurden die Proben mit ATP, Mg^{2+} und cAMP wie unter Methoden 12.3.1. aufgeführt inkubiert. Wie aus Tabelle 22 hervorgeht, wurden jedoch keine höheren Aktivitäten gefunden. Während der Inkubation nahm die Aktivität in beiden Ansätzen etwa gleich rasch ab.

Tab. 22: Aktivierungsversuch mit endogener Proteinkinase

Vorbehandlung des 100 000 g Überstandes, 5 Stdn bei 4°C	lipolytische Aktivität (n Mol FFS/mg Prot. x 60 mi Kontrolle Inkubationsdauer (min)			+ Aktivierungsmischung Inkubationsdauer (min)		
	0	10	30	0	10	30
stehen gelassen	19,3 18,4 $\bar{x}$=18,9	16,2 16,6 $\bar{x}$=16,4	11,2 10,6 $\bar{x}$=10,9	16,0 16,4 $\bar{x}$=16,2	12,0 13,0 $\bar{x}$=12,5	7,5 7,7 $\bar{x}$=7,6
dialysiert	12,7 13,3 $\bar{x}$=13,0	11,1 9,9 $\bar{x}$=10,5	6,7 7,0 $\bar{x}$=6,6	11,4 10,4 $\bar{x}$=10,9	8,4 9,2 $\bar{x}$=8,8	4,7 5,1 $\bar{x}$=4,9

Die Durchführung des Versuches erfolgte wie unter Meth. 12.3.1. beschrieben.

2.2.2. Mit zugesetzter cAMP-abhängiger Proteinkinase

Diese Untersuchungen wurden mit einer ca. 100 - 140-fach angereicherten Lipasepräparation durchgeführt. Bis zum Triton X-100-armen Überstand (Lipase III) verlief die Präparation wie bereits unter Ergebnisse I.2. beschrieben. Durch $(NH_4)_2SO_4$-Fällung wurde bei 25 - 40 % Sättigung eine Fraktion erhalten, die bei hochtouriger Zentrifugation flotierte, in 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 gelöst und über Nacht gegen 10 l des gleichen Puffers dialysiert wurde. Nach Zusatz von Glycerin (Endkonzentration 20 %) wurde die Proteinlösung auf eine DE 52-Cellulose-Säule aufgetragen und über Nacht mit 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 20 % Glycerin gewaschen. Die Lipase wurde sodann im NaCl-Gradienten (0 - 300 mM NaCl + 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 20 % Glycerin + 1 % Triton X-100) eluiert. Die reinsten Fraktionen wurden vereinigt und daraus Triton X-100 durch 2 - 3 Stdn Rühren im Kühlraum mit Bio Beads SM-2 (0,4 g/ml) entfernt. Mit dem Triton X-100-armen Eluat wurde eine fraktionierte $(NH_4)_2SO_4$-Fällung durchgeführt. Die Fraktion 25 - 40 % Sättigung wurde in 10 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5 + 20 % Glycerin gelöst und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Sie wird im folgenden als Lipase 6 bezeichnet.

Die Lipoproteinlipaseaktivität machte in dieser Fraktion 3,7 % der Lipaseaktivität aus, der Fettsäure:Glycerin-Quotient betrug 4,1:1. Diese Präparation war 1 - 2 Tage bei -20°C ohne Aktivitätsverlust haltbar. Die Abhängigkeit des Lipasetests von der Proteinkonzentration war bis 0,3 mg Protein pro Test linear. Die Abhängigkeiten des Lipasetests von derZeit, dem p_H-Wert und der Substratkonzentration entsprachen den Resultaten unter Ergebnisse I.3.1. Die Molekulargewichtsbestimmung an Sepharose 6B in Gegenwart von Triton X-100 ergab etwa 1 Million entsprechend dem Molekulargewicht für Lipase VI wie unter Ergebnisse I.3.4. beschrieben.

Aktivierungsversuche mit Proteinkinase aus Rinderherzmuskel

Das Ergebnis der Aktivierungsversuche mit dieser höher gereinigten Lipasepräparation ist der Tabelle 23 zu entnehmen. Demnach

konnte weder ohne noch mit Zusatz von Proteinkinase aus Rinderherzmuskel eine Aktivierung des Enzyms erreicht werden.

Tab. 23: Aktivierungsversuche mit Proteinkinase aus Rinderherzmuskel

Ansatz	lipolytische Aktivität (n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)	relative Aktivität (%)
1. ohne Proteinkinase 0 min	1 840 ± 359	100
2. ohne Proteinkinase 10 min	1 354 ± 451	74
3. mit Proteinkinase 10 min	1 409 ± 323	77
4. ohne Proteinkinase 10 min, Zusätze für Lipasetest nach Vorinkubation	1 426 ± 339	78

Für die Aktivierungsreaktion übernahmen wir teilweise die Bedingungen von Khoo et al. für die Aktivierung von Hühnerfettgewebe (16) und menschlichem Fettgewebe (114) wie unter Meth. 12.3.2. beschrieben. Die verwendete Proteinkinase wurde nach Meth. 12.5.2. getestet.
Aktivierungsansatz: 1. und 2.: Lipase 6[x] + Cofaktoren[xx], 3.: Lipase 6[x] + Cofaktoren[xx] + 0,06 mg Proteinkinase, 4.: Lipase 6[x], nach 10 min Vorinkubation + Cofaktoren[xx]. (Gesamtvolumen für 1. - 4.: je 1 ml)

[x] 0,5 mg Lipase 6 + 50 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 7,4
[xx] 0,5 mM ATP, 5 mM Mg-acetat, 0,01 mM cAMP, 1 mM IBMX, 1 mM DTE, 0,5 mM EGTA

Die lipolytische Aktivität ist als Mittelwert von n = 4 untersuchten Lipasepräparationen $\bar{x}$ ± Standardabweichung angegeben.

Aktivierungsversuche mit Proteinkinase aus dem Skelettmuskel der Ratte

Das Fehlen einer Lipaseaktivierung in den vorausgehenden Versuchen könnte möglicherweise auf der mangelnden Spezifität der

verwendeten Proteinkinase beruhen. Die folgenden Untersuchungen wurden deshalb mit einer aus Rattenmuskel angereicherten Proteinkinase durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 24 und 25 zusammengefaßt.

Tab. 24: Aktivierungsversuche mit Proteinkinase aus Rattenskelettmuskel

Ansatz	lipolytische Aktivität (n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)	relative Aktivität (%)
1. ohne Proteinkinase 0 min	1 197 ± 425	100
2. ohne Proteinkinase 10 min	916 ± 351	77
3. mit Proteinkinase I 10 min		
a.	925 ± 393	77
b.	934 ± 406	78
c.	941 ± 421	79
III. mit Proteinkinase II 10 min		
a.	921 ± 393	77
b.	953 ± 371	80
c.	955 ± 341	80
4. ohne Proteinkinase 10 min, Zusätze für Lipasetest nach Vorinkubation	976 ± 362	82

Die Versuchsbedingungen waren wie unter Meth. 12.3.2. beschrieben. Die Herstellung der Proteinkinase wurde nach Meth. 12.4. durchgeführt und das Enzym nach Meth. 12.5.2. getestet. Aktivierungsansatz: 1. und 2.: Lipase 6^{x} + Cofaktoren^{xx}, 3.: Lipase 6^{x} + Cofaktoren^{xx} + a. 0,03 mg Proteinkinase I, b. 0,06 mg Proteinkinase I, c. 0,12 mg Proteinkinase I, III.: Lipase 6^{x} + Cofaktoren^{xx} + a. 0,03 mg Proteinkinase II, b. 0,06 mg Pro-

teinkinase II, c. 0,12 mg Proteinkinase II, 4.: Lipase 6[x], nach 10 min Vorinkubation + Cofaktoren[xx].

[x] 0,5 mg Lipase 6 + 50 mM Na-Phosphat-Puffer p_H 7,4

[xx] 0,5 mM ATP, 5 mM Mg-acetat, 0,01 mM cAMP, 1 mM IBMX, 1 mM DTE, 0,5 mM EGTA

Die lipolytische Aktivität ist als Mittelwert von n = 6 untersuchten Lipasepräparationen $\bar{x} \pm$ Standardabweichung angegeben. Für jeden Versuch wurde eine frisch präparierte Proteinkinase verwendet.

Nach Khoo et al. (19) wird eine Aktivierbarkeit von Cholesterinester-, Diolein- und Monoolein-Hydrolase nur mit einer Kleinpartikelemulsion, hergestellt in Äthanol ohne Ultraschallbehandlung, beobachtet. Bei einer Substratkonzentration von 1 mM wurde mit einer solchen Emulsion für die Diolein-Hydrolase eine 28 %ige, bei 0,05 mM eine 83 %ige Aktivierung gefunden. In früheren Versuchen dieser Autoren (16) könnte möglicherweise nach ihrer Ansicht die geringere Aktivierbarkeit von Diolein- und Monoolein-Hydrolase im Vergleich zur Triolein-Hydrolase durch zu hohe Substratkonzentrationen maskiert worden sein.

Aufgrund dieser Angaben wiederholten wir die Aktivierungsversuche mit Proteinkinase I und Proteinkinase II mit einer 10-fach geringeren Substratkonzentration (0,4 mM) im Lipasetest, ohne jedoch die Vorschrift für die Herstellung des Substrats zu verändern. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 25.

Wie man sieht, war auch bei Verringerung der Substratkonzentration eine Aktivierung der Lipase durch Proteinkinase nicht nachweisbar.

Weitere Aktivierungsversuche dieser Art mit Triton X-100-armem 100 000 g Überstand (Lipase III) unter Zusatz eines ATP-regenerierenden Systems (vergl. Meth. 12.3.1.), mit der $(NH_4)_2SO_4$-Fraktion 0 - 25 % Sättigung (diese Fraktion der zweiten $(NH_4)_2SO_4$-Fällung wurde bei Präparation der Lipase 6 normalerweise verworfen), sowie mit einer aus Hühnerbeinmuskel präparierten Lipasefraktion ($(NH_4)_2SO_4$-Niederschlag 25 - 40 % Sättigung der ersten Fällung) verliefen ebenfalls erfolglos.

Tab. 25: Aktivierungsversuche mit Proteinkinase aus Rattenskelettmuskel bei 10-fach geringerer Substratkonzentration im Lipasetest

Ansatz	lipolytische Aktivität (n Mol FFS/mg Prot. x 60 min)	relative Aktivität (%)
1. ohne Proteinkinase 0 min	609 + 225	100
2. ohne Proteinkinase 10 min	473 + 171	78
3. mit Proteinkinsae I 10 min		
a.	445 + 146	73
b.	440 + 158	72
c.	479 + 168	79
III. mit Proteinkinase II 10 min		
a.	500 + 163	82
b.	496 + 148	81
c.	507 + 205	83
4. ohne Proteinkinase 10 min, Zusätze für Lipasetest nach Vorinkubation	529 + 225	87

Die Versuchsbedingungen waren wie unter Meth. 12.3.2. beschrieben. Der Lipasetest nach Meth. 2.2.2. wurde jedoch mit 0,1 ml 2 mM Trioleinemulsion durchgeführt. Die Herstellung der Proteinkinase wurde nach Meth. 12.4. durchgeführt und das Enzym nach Meth. 12.5.2. getestet.
Aktivierungsansatz: siehe Tab. 24
Die lipolytische Aktivität ist als Mittelwert von n = 3 untersuchten Lipasepräparationen $\bar{x} \pm$ Standardabweichung angegeben. Für jeden Versuch wurde eine frisch präparierte Proteinkinase verwendet.

2.3. Versuche zur Inaktivierung der Muskellipase

Falls die Skelettmuskellipase, in Analogie zur Fettgewebslipase, durch Phosphorylierung aktiviert wird und durch Dephosphorylierung inaktiviert werden sollte, so war es zur Erklärung der bisher negativen Aktivierungsversuche nicht auszuschließen, daß das Enzym bereits in der aktiven (phosphorylierten) Form vorlag. Im Falle der Anwesenheit von Phosphatase im Enzympräparat sollte deshalb durch Zusätze von Phosphataseaktivatoren, wie Mg^{2+}, Mn^{2+} und Ca^{2+} (Siess et al.(129) und Brandt et al. (130)) beschleunigte Inaktivierung der Lipase ausgelöst werden. Wie die Ergebnisse in Tabelle 26 zeigen, war dies jedoch nicht der Fall. Gegenüber der Kontrolle wurde bei Inkubation mit Mg^{2+}, auch zusammen mit Ca^{2+}, nur eine unwesentliche Aktivitätsabnahme (15 %) beobachtet.

Tab. 26: Inaktivierungsversuch der Lipase 6

Verwendeter Puffer, Endkonzentration während der Inkubation 50 (mM)	Zusätze	Inkubation bei 37°C (min)	relative Aktivität (%)
Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5	keine	0 30	100 91,6
Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5	5 mM $MgCl_2$	30	77,4
Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5	5 mM $MgCl_2$ + 1 mM $CaCl_2$	30	76,3
TRIS-HCl-Puffer p_H 7,0	keine	0 30	100 90,9
TRIS-HCl-Puffer p_H 7,0	5 mM $MnCl_2$	30	83,7

Nach Inkubation der Lipase 6 mit verschiedenen Zusätzen wurde der Lipasetest nach Meth. 2.2.2. durchgeführt. Die Inkubation mit Mn^{2+} und die dazugehörige Kontrolle wurden in TRIS-HCl-Puffer p_H 7,0 vorgenommen, die übrigen in Na-Phosphat-Puffer p_H 6,5. Eine lipolytische Aktivität von 1 440 n Mol FFS/mg Prot. x 60 min entspricht 100 %.

2.4. Phosphorylierungsversuche mit γ^{32}P-ATP

Als Erklärung für die Mißerfolge einer Lipaseaktivierung durch cAMP-abhängige Proteinkinase, ATP und Mg^{2+} wurde schließlich in Betracht gezogen, daß die untersuchte Lipasepräparation einen oder mehrere Proteinkinase-Inhibitor(en) enthält, wodurch die Phosphorylierung des Enzyms verhindert wird. Um dies auszuschließen, wurde der Einbau von Phosphat aus γ^{32}P-ATP durch Proteinkinase in die Lipase 6 untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tab. 27: Phosphorylierung der Lipase 6 durch Proteinkinase aus dem Skelettmuskel der Ratte

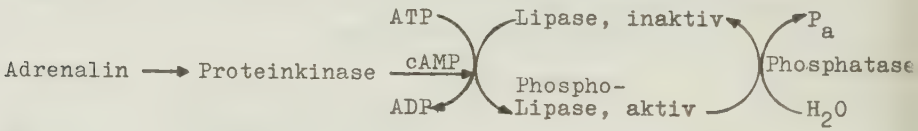
Substrat	Proteinkinaseaktivität (n Mol eingebautes ^{32}P/Ansatz)			
	Proteinkinase I		Proteinkinase II	
	– cAMP	+ cAMP	– cAMP	+ cAMP
Casein (1 200 µg)	0,147	1,078	0,128	0,660
Lipase (245 µg)	0,183	0,349	0,236	0,248
Casein + Lipase (600 µg + 122,5 µg)	0,193	0,652	0,151	0,356

Testbedingungen nach Meth. 12.5.2., jedoch mit doppeltem Ansatz. Es wurden 60 µg Proteinkinase I der s.A. = 0,898 n Mol eingebautes ^{32}P/mg Prot. x min bzw. 50 µg Proteinkinase II der s.A. = 0,660 n Mol eingebautes ^{32}P/mg Prot. x min eingesetzt. Der Phosphateinbau in die Proteinkinase selbst wurde abgezogen.

Demnach wird in Anwesenheit der Proteinkinase I Phosphat in cAMP-abhängiger Reaktion in die Lipase 6 eingebaut. Dies, sowie auch die mit Lipase und Casein erhaltenen Daten zeigen, daß eine wesentliche Hemmung der Proteinkinase in diesem System nicht vorliegt. Ob die Phosphorylierung die Lipase selbst betrifft, muß offen bleiben, da es sich nicht um eine einheitliche Proteinfraktion handelte.

D. DISKUSSION

Die Anregung zu dieser Arbeit ging von Muskelperfusionsversuchen aus, die gezeigt hatten, daß unter der Wirkung des ß-Rezeptoragonisten Isoproterenol vermehrt Glycerin in das Medium abgegeben wurde. Dies und andere Versuche mit isoliertem Rattenzwerchfell, in denen Adrenalin ebenfalls zur gesteigerten Glycerinbildung führte, deutete auf eine Aktivierung der Lipolyse endogener Triglyceride des Muskels durch die genannten Substanzen hin. In Analogie zu den Verhältnissen im Fettgewebe lag die Vermutung nahe, daß auch im Skelettmuskel eine hormonsensitive Lipase existiert, die nach folgendem Mechanismus reguliert wird:



Es sollte deshalb versucht werden, eine hormonsensitive Lipase aus Skelettmuskel zu isolieren und deren Eigenschaften näher zu charaktisieren.

Die einzige bisher beschriebene Anreicherung einer Skelettmuskellipase erfolgte aus Schweinemuskel (93), jedoch wurde die Frage der Hormonsensitivität dieses Enzyms nicht untersucht. Dieses Enzym scheint leicht mit wäßrigen Medien extrahierbar zu sein, ähnlich wie auch die Rattenfettgewebslipase, die sich nach Zentrifugation eines isotonischen Homogenats zu 80 % im Überstand befindet (131). Im Gegensatz hierzu kann die Lipase aus Rattenskelettmuskel nur in Anwesenheit von Triton X-100 in Lösung gebracht und getestet werden. Eine Reihe anderer Detergenzien waren vergleichsweise viel weniger wirksam. Dies gilt auch für verschiedene Phospholipide, von denen in anderen Fällen, wie z.B. der ß-Hydroxybutyratdehydrogenase (132), einer Collagen-galactosyl- bzw. -glucosyltransferase (133), einer Triglyceridlipase aus Rattenleber (120) - (122) etc. bekannt ist, daß sie für die Enzymaktivität essentiell sind. Für die Isolierung von Membranproteinen, z.B. des Cytochrom b-c_1 Komplexes oder der Adeninnukleotidtranslokase aus Mitochondrien (134), (135) und der

1-Acyl-glycerophosphat- und 1-Acyl-glycerophosphorylcholin-acyltransferase aus Mikrosomen (136) hat sich jedoch gleichfalls Triton X-100 als weitaus am besten erwiesen. Das Löslichkeitsverhalten der Muskellipase läßt darauf schließen, daß das Enzym an Membranstrukturen der Zelle gebunden ist.

Nachdem es mit Triton X-100 gelungen war, Lipase aus Skelettmuskel zu extrahieren, wurde zunächst versucht, nach vorhergehender Isoproterenolgabe am intakten Tier eine Aktivitätssteigerung des Enzyms im rohen Muskelextrakt (100 000 g Überstand) nachzuweisen. Dies gelang nicht. Eventuell war der Grund dafür, daß eine Aktivierung des Enzyms durch Inaktivierung während der Herstellung der Gewebeextrakte maskiert wurde.

Für die weiteren Untersuchungen zur Frage der Regulation der Lipase durch kovalente Modifizierung wurde deshalb auf ein in vitro System übergegangen. Um Störungen, z.B. durch Phosphatase(n) auszuschalten, wurde eine 100 - 140-fach angereicherte Lipasefraktion verwendet. Alle Bemühungen, das Enzym durch Behandlung mit Proteinkinase (sowohl aus Rinderherzmuskel, als auch aus Rattenskelettmuskel), ATP, Mg^{2+} und cAMP zu aktivieren, blieben erfolglos. Eine Hemmung der Proteinkinase möglicherweise durch das Lipasepräparat wurde ausgeschlossen. Ebenso ergaben sich keine Hinweise dafür, daß die Lipase eventuell bereits völlig im phosphorylierten Zustand vorlag und deshalb im Proteinkinase-System keine Aktivierung mehr stattfinden konnte. Bei Versuchen mit γ^{32}P-ATP wurde ^{32}P in die Lipasefraktion eingebaut, wobei allerdings offen bleibt, ob es sich um die Lipase selbst, oder um Begleitproteine handelt. Dieser Frage wurde nicht weiter nachgegangen, da die Phosphorylierung offenbar nicht von regulatorischer Bedeutung für das Enzym war.

Obwohl es immer noch möglich ist, daß in den in vitro Systemen spezielle Komponenten fehlen, ist doch mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß es sich bei der hier untersuchten Lipase nicht um ein durch das Adenylatcyclase-Proteinkinase-System regulierbares Enzym handelt. Dies wirft ein neues Licht auf die lipolytische Wirkung von Adrenalin am intakten Muskel, indem

möglicherweise in den Muskel eingelagerte Fettzellen, und nicht die Muskelzellen selbst, auf das Hormon ansprechen. Obzwar diese Fettzell-Lipase vermutlich mitextrahiert wurde, wäre sie jedenfalls im Rattenmuskel anteilmäßig zu gering, um als hormonsensitiv erkannt zu werden. Dagegen erscheint es nicht ausgeschlossen, daß die Lipase aus Schweineskelettmuskel (93) mit seinem hohen Fettgehalt zum Teil als Fettgewebslipase anzusprechen ist, wofür unter anderem auch das Löslichkeitsverhalten des Enzyms bei der Extraktion mit wäßrigen Medien sprechen würde.

Nachdem die spezielle Frage der kovalenten Modifizierung als abgeschlossen betrachtet werden konnte, ging es im folgenden um die weitere Charakterisierung der hier beschriebenen Lipase aus Rattenskelettmuskel. Die ausgeprägte Triton X-100-Abhängigkeit während der Enzymextraktion wurde eingangs bereits erwähnt. Triton X-100 war aber nicht nur für die Solubilisierung, sondern auch für die Aktivitätsbestimmung der Lipase im Testansatz unentbehrlich und konnte weder durch Phospholipide, noch durch andere Detergenzien ersetzt werden. Es ist anzunehmen, daß Triton X-100 hier eine Art Membranfunktion übernimmt, indem es durch Micellenbildung das Enzym in Lösung hält und damit seine Wechselwirkung mit dem Triolein ermöglicht. Die Detergenzabhängigkeit scheint von Enzym zu Enzym verschieden zu sein. So arbeitet z.B. eine Lipase aus Mausskelettmuskel am besten mit Cutscum (94), eine Rattenherzmuskel-Lipase dagegen mit Lubrol (68). Andere Lipasen, die in Homogenaten von Schweine- (93), Kaninchen- und Rattenskelettmuskel, sowie Rattenherzmuskel (92) nachgewiesen wurden, scheinen wiederum überhaupt nicht der Anwesenheit eines Detergenzes zu bedürfen.

Die weitere Reinigung der Lipase aus dem 100 000 g Überstand erfolgte nach üblichen Trennungsverfahren und führte zu einem Enzympräparat mit etwa 200-facher spezifischer Aktivität gegenüber dem Muskelhomogenat (s.A. $\sim$ 2,8 μMol FFS/mg Prot. x 60 min).

Lipoproteinlipase kann auf Grund verschiedener Kriterien, wie Hemmbarkeit durch 1 M NaCl, durch Protaminsulfat, durch Triton X-100, wie hier gezeigt wurde (Tab. 1), der Abhängigkeit vom im

Serum vorhandenen Apolipoprotein C-II als Aktivator (137), (138) und durch ein anderes p_H-Optimum von der Lipase unterschieden werden. Anhand dieser Kriterien, die vorher mit lipoproteinlipasehaltigem Rattenplasma (Postheparinplasma) überprüft wurden, lagen im Skelettmuskel-100 000 g Überstand etwa 3 % der gesamten Lipaseaktivität als Lipoproteinlipase vor. In den reinsten Lipasefraktionen war keine Lipoproteinlipaseaktivität mehr nachweisbar.

Die Hemmung der Muskellipase durch NaF wurde auch für Lipasen aus Rattenfettgewebe (139) und aus Mäuseskelettmuskel (94) beschrieben. Anders als in den vorliegenden Studien wurden jedoch weder Rattenfettgewebs- (139) noch Schweineskelettmuskel-Lipase (93) durch 1 M NaCl beeinflußt. Die deutliche Hemmung der Rattenskelettmuskel-Lipase durch NaCl erinnert an das Verhalten der Lipoproteinlipase und könnte eventuell auf Inaktivierung des Enzyms durch hohe Ionenstärke zurückgehen. Nach den Versuchen mit SH-Reagenzien und mit EGTA scheint die Rattenskelettmuskel-Lipase weder ein SH- noch ein Ca^{2+}-abhängiges Enzym zu sein. Auffallend erscheint eine starke Empfindlichkeit gegenüber Zinksalzen, die durch EDTA partiell aufgehoben wurde. Protaminsulfat hatte keine, Serum dagegen eine deutliche Hemmwirkung. Damit unterscheidet sich die vorliegende Lipase eindeutig von Lipoproteinlipase. Die Wirkung des Serums dürfte auf die γ-Globulinfraktion zurückzuführen sein. Sie erscheint von physiologischem Interesse, da über natürliche Lipaseblocker und ihre mögliche Rolle - anders als bei den Proteinaseblockern des Serums - bisher wenig bekannt ist. Mit einer Triglyceridlipase aus Hefemitochondrien (140) hat die Muskellipase die Hemmbarkeit durch Oleat gemein. Da halbmaximale Wirkung schon bei 0,8 mM Oleat eintritt, ist eine Feedback-Kontrolle des Enzyms durch Fettsäuren in vivo nicht von der Hand zu weisen.

Das durch Sephadex-Chromatographie ermittelte Molekulargewicht der Lipase von 1 Million muß mit der Einschränkung betrachtet werden, daß die Untersuchungen in Anwesenheit von Triton X-100 zu erfolgen hatten. Da es sich nicht um ein vollständig reines Enzympräparat handelte, war die an die Lipase gebundene Triton

X-100-Menge nicht zu bestimmen.

Auf die Selektivität von Triton X-100 als Lösungsvermittler bei der Extraktion und Aktivitätsbestimmung der Lipase wurde bereits hingewiesen. Die in Tabelle 13 aufgeführten Versuche machen noch einmal deutlich, daß keines der untersuchten Phospholipide auch nur annähernd die Wirkung von Triton X-100 im Test ersetzen konnte. Es sei darauf hingewiesen, daß in jedem Fall der Konzentrationsbereich sehr sorgfältig abgegriffen wurde, um Aktivierungseffekte, soweit sie nur innerhalb enger Grenzen auftreten sollten, nicht zu übersehen. Eine sachliche Begründung für die unterschiedliche Wirkung von Detergenzien auf verschiedene Enzyme ist schwer zu finden, sodaß die richtige Auswahl zumeist nur empirisch getroffen werden kann.

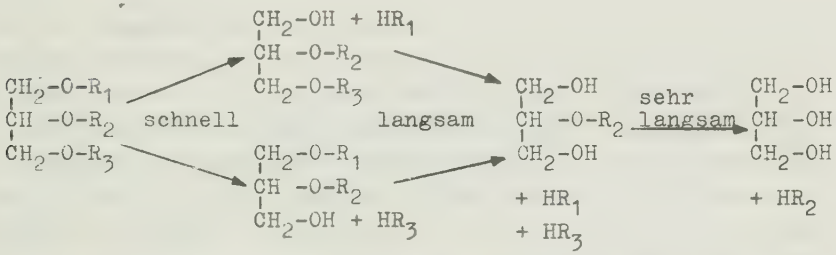
Auch für die elektrophoretische Untersuchung der Lipase erwies sich Triton X-100 als essentielle Komponente. In Triton X-100-haltigen Polyacrylamidgelen lieferte die hochgereingte Fraktion Lipase VII zwei Banden, während ohne Triton X-100 die Hauptmenge des Proteins auf dem Gel liegen blieb (Abb. 16a, 16b). Bei Verwendung trioleinhaltiger Gele (nach Lakshmi (110) modifiziert) gelang es, die Muskellipase direkt durch Anfärben der nach Inkubation im Gel freigesetzten Fettsäuren sichtbar zu machen. Die Zuordnung zu einer bestimmten Proteinbande war aber auf diese Weise nicht möglich, da die trioleinhaltigen Parallelgele bei Färbung mit Coomassie-Blau keine klare Proteintrennung zeigten. Schließlich gelang es aber, durch Fraktionierung und Elution der Gele die Lipaseaktivität der ersten Bande zuzuordnen (Abb. 18).

Bei der Prüfung der Substratspezifität wurde von dem reinsten Lipasepräparat VII Oleoyl-CoA mit einem Viertel und Cholesteryl-Oleat mit etwa 1/20 der Geschwindigkeit von Triolein gespalten. Ob diese Aktivitäten der Lipase selbst, oder einer Verunreinigung mit Acyl-CoA-Hydrolase bzw. Cholesterinester-Hydrolase zuzuordnen sind, ist schwer zu sagen. Acetyl-CoA wurde nicht gespalten.

Bei totaler Hydrolyse von Triolein sollten Fettsäuren und Gly-

cerin im molaren Verhältnis 3 : 1 auftreten. Die gereinigte Muskellipase lieferte Fettsäuren und Glycerin im Verhältnis 8,6 : 1, d.h. Triolein wurde nicht vollständig gespalten. Dementsprechend wurden bei dünnschichtchromatographischer Analyse Diolein und Monoolein als Spaltprodukte gefunden, allerdings in diesem Versuch nicht ganz in der erwarteten Menge (Tab. 16). Das Verhalten der Muskellipase spricht damit für eine höhere Affinität des Enzyms zum Triolein. Während der Reaktion werden die Fettsäuren vermutlich nacheinander abgespalten, da im Reaktionsgemisch Di- und Monoolein, sowie Fettsäuren und Glycerin vorliegen.

In der Gruppe der lipolytischen Enzyme ist die Pankreaslipase am intensivsten untersucht. Für sie wird der folgende Reaktionsverlauf angenommen (141):



Nach Savary et al. (142) werden die Fettsäuren in 1- und 3-Stellung bevorzugt abgespalten, jedoch liegen 10 - 20 % des Monoglycerids als 1-Monoglycerid vor. Daraus wird gefolgert, daß die Lipase entweder nicht streng 1,3-spezifisch ist, oder daß eine Umesterung erfolgt. In sauberen Lipasepräparaten wurden keine für Tri-, Di- und Monoglycerid spezifischen Aktivitäten gefunden (143), (144), woraus geschlossen werden kann, daß die Pankreaslipase ein unspezifisches Enzym für alle drei Glyceride ist. Ähnliche Verhältnisse könnten bei der Muskellipase vorliegen. Für die Lipase aus Rhizopus arrhizus wird eine Spaltung des Triglycerids bis zum Diglycerid angenommen. Erst der Zusatz von Esterase aus Schweineleber ermöglicht eine völlige Durchspaltung des Substrats in Fettsäuren und Glycerin (145), was für analytische Zwecke ausgenutzt wird.
Für eine Lipoproteinlipase aus Postheparinplasma werden spezi-

fische Enzymaktivitäten für Tri-, Di- und Monoglycerid postuliert, wobei die Triglyceridlipase die 2-Stellung gegenüber der 1- und 3-Stellung bevorzugt (146).

Was schließlich die physiologische Rolle der Muskellipase angeht, so wäre zu erwarten gewesen, daß es bei Zuständen gesteigerten Energiebedarfs zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms und damit zu einer Mobilisierung endogener Triglyceriddepots kommen würde. Dies war aber nicht der Fall. Im Gegenteil war die Lipaseaktivität im Muskel 48 Stdn gehungerter Ratten erniedrigt und blieb bei diabetischen Tieren unverändert. Nach Untersuchungen von Weisenburg Delorme et al. (5), von Hollenberg (79) und von Linder et al. (80) steigt dagegen im Hunger die Lipoproteinlipaseaktivität im Skelett- und Herzmuskel an. Borensztajn et al. (78) untersuchten mit gleichem Ergebnis nur Herzmuskel.

Dies würde bedeuten, daß der Muskel unter Bedingungen gesteigerten Energiebedarfs vermehrt auf extrazelluläre und weniger auf intrazelluläre Triglyceride zurückgreift. Das hier beobachtete Verhalten der Muskellipase bei Hunger und Diabetes muß im Zusammenhang mit den übrigen Ergebnissen dieser Arbeit als ein weiterer Hinweis darauf gedeutet werden, daß die Lipolyse des Muskels nicht durch ein hormonsensitives System wie im Fettgewebe gesteuert wird.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob der Skelettmuskel - ähnlich wie das Fettgewebe - über ein hormonsensitives Enzymsystem zur Mobilisierung endogener Lipide verfügt. Neben sehr geringen Mengen einer Lipoproteinlipase konnte aus Rattenskelettmuskel eine Lipase etwa 200-fach angereichert werden, die nach ihren Eigenschaften als Triglyceridlipase anzusprechen ist. In der Polyacrylamidgel-Elektrophorese zeigte die reinste Fraktion noch zwei Banden, deren eine nach Elution die Lipaseaktivität enthielt. Sowohl für die Extraktion, als auch für die Aktivitätsbestimmung des Enzyms erwies sich die Anwesenheit von Triton X-100 als unerläßlich, was darauf hindeutet, daß es sich um ein an Lipidstrukturen gebundenes Enzym handelt.

Die angereicherte Lipase enthielt keine Lipoproteinlipaseaktivität. Nach Gelfiltration an Sepharose 6B in Gegenwart von Triton X-100 ergab sich ein Molekulargewicht von etwa 1 Million. Bei Substratsättigung (4 mM Triolein) und 0,2 - 0,4 % Triton X-100 lag das p_H-Optimum bei p_H 6,5. Phospholipide konnten Triton X-100 nicht ersetzen.

Die Muskellipase wird durch Natriumfluorid und durch Zinksalze gehemmt. Nach Untersuchungen mit Chelatbildnern und Sulfhydrylblockern ist die Lipase kein metallabhängiges Enzym und besitzt keine für die Katalyse essentiellen SH-Gruppen. Oleat hemmt die Lipase in physiologischen Konzentrationen, was für die Kontrolle der Lipolyse des Muskels eine Rolle spielen könnte. Bemerkenswert erscheint auch die Beobachtung einer Hemmung des Enzyms durch Serum, die auf (eine) hitzestabile, nicht dialysierbare Komponente(n) der γ-Globulinfraktion zurückgeführt wurde. Die Aufklärung dieses(r) natürlichen Lipase-Inhibitors(en) wäre von physiologischem Interesse.

Untersuchungen zur Substratspezifität ergaben, daß - bezogen auf die Aktivität mit Triolein (100 %) - Cholesteryloleat zu 5,7 % und Oleoyl-CoA zu 25 % gespalten wurden. Acetyl-CoA wurde von der Lipase nicht umgesetzt.

Diabetes, Hunger oder Injektion von Isoproterenol am Ganztier führten zu keiner Erhöhung der aus dem Muskel extrahierbaren Lipaseaktivität. Dasselbe gilt für in vitro Inkubationen von Rattenzwerchfell in Anwesenheit von Isoproterenol. Auch Versuche mit Lipasepräparationen verschiedener Reinheitsstufen, die mit ATP, Mg^{2+}, cAMP und spezies-spezifischer Proteinkinase aus Rattenmuskel behandelt wurden, ergaben keinen Anhalt für eine Aktivierung bzw. Inaktivierung des Enzyms durch kovalente Modifizierung. Es muß deshalb nach allem der Schluß gezogen werden, daß die Lipase des Skelettmuskels nicht durch ein hormonabhängiges Adenylatcyclase-Proteinkinasesystem reguliert wird.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. O. Stein, Y. Stein, N.H. Fidge, D.S. Goodman;
   J. Cell. Biol. 43, 410 - 431 (1969)

2. M. Hamosh, P. Hamosh;
   Biochim. Biophys. Acta 380, 132 - 140 (1975)

3. J.M. Felts;
   in: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Pharmacology of Lipid Transport and Atherosclerotic Processes ed. E.J. Masoro, Sect. 24,1: 375 - 402
   Oxford: Pergamon (1975)

4. D.S. Robinson;
   in: Comprehensive Biochemistry. Lipid Metabolism eds. M. Florkin, E.H. Stotz, 18, 51 - 116 Amsterdam Elsevier (1970)

5. C.L. Weisenburg Delorme, K.L. Harris;
   J. Nutr. 105, 447 - 451 (1975)

6. A.S. Garfinkel, P. Nilson-Ehle, M.C. Schotz;
   Biochim. Biophys. Acta 424, 264 - 273 (1976)

7. E.J. Blanchette-Mackie, R.O. Scow;
   J. Cell. Biol. 58, 689 - 708 (1973)

8. S. Eisenberg, R.I. Levy;
   Adv. Lipid Res. 13, 1 - 89 (1975)

9. O. Wieland, M. Suyter;
   Biochem. Ztschr. 329, 320 - 331 (1957)

10. R.J. Havel, J.P. Kane, M.L. Kashyap;
    J. Clin. Invest. 52, 32 - 38 (1973)

11. J.D. Corbin, E.M. Reimann, D.A. Walsh, E.G. Krebs;
    J. Biol. Chem. 245, 4 849 - 4 851 (1970)

12. J.K. Huttunen, D. Steinberg, S.E. Mayer;
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 290 - 295 (1970)

13. J.K. Huttunen, D. Steinberg;
Biochim. Biophys. Acta 239, 411 - 427 (1971)

14. P. Belfrage, B. Jergil, P. Strålfors, H. Tornquist;
FEBS Lett. 75, 259 - 264 (1977)

15. J.C. Khoo, P.J. Sperry, G.N. Gill, D. Steinberg;
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 4 843 - 4 847 (1977)

16. J.C. Khoo, D. Steinberg;
J. Lipid Res. 15, 602 - 610 (1974)

17. A.M.S. Gorban, G.S. Boyd;
FEBS Lett. 79, 54 - 58 (1977)

18. T. Kuno, F.W. Barham;
J. Biol. Chem. 248, 7 417 - 7 426 (1973)

19. J.C. Khoo, D. Steinberg, J.J. Huang, P.R. Vagelos;
J. Biol. Chem. 251, 2 882 - 2 890 (1976)

20. S. Wallat, W.H. Kunau;
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 949 - 960 (1976)

21. G.J. Beckett, G.S. Boyd;
Eur. J. Biochem. 72, 223 - 233 (1977)

22. R.C. Pittmann, D. Steinberg;
Biochim. Biophys. Acta 487, 431 - 444 (1977)

23. D.L. Severson, J.C. Khoo, D. Steinberg;
J. Biol. Chem. 252, 1 484 - 1 489 (1977)

24. J.C. Khoo, D. Steinberg, E.J.C. Lee;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 418 - 423 (1978)

25. J.R. Evans, L.H. Opie, J.C. Shipp;
Am. J. Physiol. 205, 766 - 770 (1963)

26. R.M. Denton, P.J. Randle;
Nature 208, 488 (1965)

27. F.B Ballard, W.H. Danforth, S. Naegle, R.J. Bing;
J. Clin. Invest. 39, 717 - 723 (1960)

28. K.L. Zierler, A. Maseri, D. Klassen, D. Rabinowitz,
J. Burgess;
Trans. Assoc. Am. Physicians 81, 266 - 273 (1968)

29. R.J. Havel, L.G. Ekelund, A. Holmgren;
J. Lipid Res. 8, 366 - 373 (1967)

30. G.R. Dagenais, R.G. Tancredi, K.L. Zierler;
J. Clin. Invest. 53, 421 - 431 (1976)

31. T.N. Masters, V.V. Glaviano;
J. Pharmacol. Exp. Ther. 182, 246 - 255 (1972)

32. S. Patton, I.M. Zulak, E.G. Trams;
J. Mol. Cell. Cardiol. 7, 857 - 865 (1975)

33. J. Wahren, L. Hagenfeld, P. Felig;
Isr. J. Med. Sci. 11, 551 - 559 (1975)

34. J.R. Neely, M.J. Rovette, J.F. Oram;
Prog. Cardiovasc. Res. 15, 289 - 329 (1972)

35. J.R. Neely, R.H. Bowmann, H.E. Morgan;
Am. J. Physiol. 216, 804 - 811 (1969)

36. J.C. Shipp, L.H. Opie, D. Challoner;
Nature 189, 1 018 - 1 019 (1961)

37. J.R. Neely, R.M. Denton, P.S. England, P.J. Randle;
Biochem. J. 128, 147 - 159 (1972)

38. M.F. Crass III, E.S. McCaskill, J.C. Shipp, V.K. Murthy;
Am. J. Physiol. 220, 428 - 435 (1971)

39. E.M. Neptune, H.C. Sudduth, D.R. Foreman, F.J. Fash;
J. Lipid Res. 1, 229 - 235 (1960)

40. M.E. Volk, R.H. Millington, S. Weinhouse;
J. Biol. Chem. 195, 493 - 501 (1952)

41. R.E. Olson, R.J. Hoescher;
Biochem. J. 103, 796 - 801 (1967)

42. E.J. Masoro, L.B. Rowell. R.M. McDonald, B. Steiert;
J. Biol. Chem. 241, 2 626 - 2 634 (1966)

43. E.J. Masoro;
J. Biol. Chem. 242, 1 111 - 1 114 (1967)

44. O. Stein, Y. Stein;
J. Cell. Biol. 36, 63 - 77 (1968)

45. R.M. Denton, P.J. Randle;
Biochem. J. 104, 416 - 422 (1967)

46. P.P. Mathur, C.M. Mokler;
J. Mol. Cell. Cardiol. 7, 17 - 26 (1975)

47. D.R. Challoner, D. Steinberg;
Nature 205, 602 - 603 (1965)

48. R.A. Kreisberg;
Am. J. Physiol. 210, 385 - 389 (1966)

49. J.R. Williamson;
J. Biol. Chem. 239, 2 721 - 2 729 (1964)

50. M.F. Crass III;
Recent Adv. Stud. Card. Struct. Metab. 3, 275 - 290 (1973)

51. S.L. Gartner, G.V. Vahouny;
Am. J. Physiol. 222, 1 121 - 1 124 (1972)

52. M.F. Crass III, J.C. Shipp, G.M. Pieper;
Am. J. Physiol. 228, 618 - 627 (1975)

53. M.F. Crass III;
Fed. Proc. 36, 1 995 - 1 999 (1977)

54. D.R. Christian, G.S. Kilsheimer, G. Pettett, R. Paradise, J. Ashmore;
Adv. Enzyme Regul. 7, 71 - 82 (1969)

55. D.G. Satchell, S.E. Freeman, S.V. Edwards;
Biochem. Pharmacol. 17, 45 - 54 (1968)

56. J.J. Lech, G.J. Jesmok, D.N. Calvert;
Fed. Proc. 36, 2 000 - 2 008 (1977)

57. V.V. Glaviano, T. Masters;
Am. J. Physiol. 220, 1 187 - 1 193 (1971)

58. S. Keely, J.D. Corbin, C.R. Park;
J. Biol. Chem. 250, 4 832 - 4 840 (1975)

59. J. Borensztajn, M.S. Rone, T. Sandros;
Biochim. Biophys. Acta 398, 394 - 400 (1975)

60. T. Chajek, O. Stein, Y. Stein;
Biochim. Biophys. Acta 388, 260 - 267 (1975)

61. D.S. Robinson, M.A. Jennings;
J. Lipid Res. 6, 222 - 227 (1965)

62. H. Jansen, W.C. Hülsmann;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 747 - 751 (1975)

63. P. Björntorp, R.H. Furmann;
Am. J. Physiol. 203, 323 - 326 (1962)

64. O. Shousboe, P.D. Bartels, P.K. Jensen;
FEBS Lett. 35, 279 - 283 (1973)

65. M. Yamamoto, G.I. Drummond;
Am. J. Physiol. 213, 1 365 - 1 370 (1967)

66. S. Mallov, A.A. Alousi;
Am. J. Physiol. 216, 794 - 799 (1968)

67. M.F. Crass III;
Biochim. Biophys. Acta 280, 71 - 81 (1972)

68. G.J. Jesmok, S.R. Mogelnicki, J.J. Lech, D.N. Calvert;
J. Mol. Cell. Cardiol. 8, 283 - 298 (1976)

69. S.R. Mogelnicki, J.J. Lech, D.N. Calvert;
Fed. Proc. 32, 712 (Abstract) (1973)

70. S.R. Mogelnicki, J.J. Lech, D.N. Calvert;
Pharmacologist 15, 230 (Abstract) (1973)

71. Y. Biale, E. Gorin, E. Shafrir;
Biochim. Biophys. Acta 152, 28 - 39 (1968)

72. J.C. George, P.T. Iype;
Am. J. Physiol. 204, 165 - 167 (1963)

73. M. Shimoda;
Jpn. Circ. J. 32, 813 - 817 (1968)

74. G.J. Bagby, M.S. Liu, J.A. Spitzer;
Life Sci. 21, 467 - 474 (1977)

75. Ch. Ehnholm, P.K.J. Kinnunen, J.K. Huttunen, E.A. Nikkilä, M. Ohta;
Biochem. J. 149, 649 - 655 (1975)

76. J.-S. Twu, A.S. Garfinkel, M.C. Schotz;
Atherosclerosis 22, 463 - 472 (1975)

77. J. Chung, A.M. Scanu;
J. Biol. Chem. 252, 4 202 - 4 209 (1977)

78. J. Borensztajn, S. Otway, D.S. Robinson;
J. Lipid Res. 11, 102 - 110 (1970)

79. C.H. Hollenberg;
J. Clin. Invest. 39, 1 282 - 1 287 (1960)

80. C. Linder, S.S. Chernick, T.R. Fleck, R.O. Scow;
Am. J. Physiol. 231, 860 - 864 (1976)

81. J. Borensztajn, P. Keig, A.H. Rubenstein;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 603 - 608 (1973)

82. J. Borensztajn, M.S. Rone, S.P. Babirac, J.A. McGarr, L.B. Oscai;
Am. J. Physiol. 229, 394 - 397 (1975)

83. M.H. Tan, R.J. Havel;
Diabetes 24, Suppl. 2, 417 (1975)

84. T.J. Kotlar, J. Borensztajn;
Am. J. Physiol. 233, E 316 - E 319 (1977)

85. N. Bégin-Heick, H.M.C. Heick;
Can. J. Biochem. 55, 1 241 - 1 243 (1977)

86. H. Lithell, J. Boberg;
Biochim. Biophys. Acta 528, 58 - 68 (1978)

87. D.P. Wallach;
J. Lipid Res. 9, 200 - 206 (1968)

88. J.C. George, C.L. Talesara;
J. Cell. Comp. Physiol. 58, 253 - 260 (1961)

89. J.C. George, C.L. Talesara;
J. Cell. Comp. Physiol. 60, 33 - 39 (1962)

90. J.C. George, N.V. Vallyathan;
Can. J. Physiol. Pharmacol. 42, 447 - 451 (1964)

91. E. Stevenson;
J. Insect Physiol. 15, 1 537 - 1 550 (1969)

92. B. Crabtree, E.A. Newsholme;
Biochem. J. 130, 697 - 705 (1972)

93. P. Kinnunen, Ch. Ehnholm;
Eur. Soc. Clin. Invest. Abstracts, 45p (1975)

94. J.J. Jato-Rodriguez, A.J. Hudson, K.P. Strickland;
Biochim. Biophys. Acta 348, 1 - 13 (1974)

95. F. Reimer, G. Löffler, R. Gerbitz, O.H. Wieland;
Z. Physiol. Chem. 354, 1 232 (1973)

95a. N.A. Abumrad, S.B. Stearns, H.M. Tepperman, J. Tepperman;
J. Lipid Res. 19, 423 - 432 (1978)

96. J.C. Khoo, D. Steinberg;
Meth. Enzymol. 35, 181 - 189 (1975)

97. A. Noma, H. Orimo;
Jpn. Circ. J. 39, 334 - 338 (1975)

98. C.J. Fielding;
Biochim. Biophys. Acta 178, 499 - 507 (1969)

99. C.J. Fielding;
Biochim. Biophys. Acta 280, 569 - 578 (1972)

100. C.J. Fielding;
Biochim. Biophys. Acta 159, 94 - 102 (1969)

101. R.M. Kraus, H.G. Windmueller, R.L. Levy, D.S. Fredrickson;
J. Lipid Res. 14, 286 - 295 (1973)

102. L. Weiss;
persönliche Mitteilung

103. J.R. Dulley, P.A. Grieve;
Analyt. Biochem. 64, 136 - 141 (1975)

104. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall;
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

105. H.S. Garewal;
Analyt. Biochem. 54, 319 - 324 (1973)

106. P.W. Holloway;
Analyt. Biochem. 53, 301 - 308 (1973)

107. P.B. Garland;
in: Methoden der enzymatischen Analyse ed. H.U. Bergmeyer,
S. 2 029 - 2 036, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße (1974)

108. H.R. Maurer;
Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter Verlag Berlin (1968)

109. B. Dewald, J.T. Dulaney, O. Touster;
Meth. Enzymol. 32, 82 - 91 (1974)

110. M.B. Lakshmi, D. Subrahmanyam;
J. Chromat. 130, 441 - 443 (1977)

111. H.A. Krebs, K. Henseleit;
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33 - 66 (1932)

112. S. Tsai, P. Belfrage, M. Vaughan;
J. Lipid Res. 11, 466 - 472 (1970)

113. J.C. Khoo, W.W. Fong, D. Steinberg;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 407 - 413 (1972)

114. J.C. Khoo, A.A. Aquino, D. Steinberg;
J. Clin. Invest. 53, 1 124 - 1 131 (1974)

115. E.M. Reimann, D.A. Walsh, E.G. Krebs;
J. Biol. Chem. 246, 1 986 - 1 995 (1971)

116. V. Kinzel, D. Kübler;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 257 - 264 (1976)

117. E. Mijamoto, J.F. Kuo, P. Greengard;
J. Biol. Chem. 244, 6 395 - 6 402 (1969)

118. M. Eggstein, E. Kuhlmann;
in: Methoden der enzymatischen Analyse ed. H.U. Bergmeyer, S. 1 871 - 1 878, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße (1974)

119. D. Banauch, W. Brümmer, W. Ebeling, H. Metz, H. Rindfrey, H. Lang, K. Leybold, W. Rick;
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 101 - 107 (1975)

120. L. Weiss;
Arbeitsbericht zu We 371/3; Arbeitsgruppe "Wechselseitige Beziehungen zwischen Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel" im Schwerpunktprogramm "Ernährungsforschung" (1969)

121. M. Karija, A. Kaplan;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1 252 - 1 257 (1971)

122. M. Karija, A. Kaplan;
J. Lipid Res. 14, 243 - 249 (1973)

123. H. Brockerhoff, R.G. Jensen;
Lipolytic Enzymes, S. 97, Acad. Press New York, San Franzisco, London (1974)

124. R.J. Henry;
Clinical Chemistry, Principles and Technics, S. 207, Harper u. Row New York, Evanston, London und J. Weatherhill Inc. Tokyo (1966)

125. N.S. Radin;
Meth. Enzymol. XIV, 245 - 254 (1969)

126. A. Verine, P. Salers, M. Ronard, J. Boyer;
FEBS Lett. 66, 127 - 131 (1977)

127. H. Vavřinková, B. Mosinger;
Abstracts 9. FEBS-Kongress, S. 363 (1974)

128. P.B. Garland, P.J. Randle;
Nature 199, 381 - 382 (1963)

129. E.A. Siess, O.H. Wieland;
Eur. J. Biochem. 26, 96 - 105 (1972)

130. H. Brandt, Z.L. Capulong, E.Y.C. Lee;
J. Biol. Chem. 250, 8 038 - 8 044 (1975)

131. C.J. Khoo, L. Jarett, S.E. Mayer, D. Steinberg;
J. Biol. Chem. 247, 4 812 - 4 818 (1972)

132. P. Gazzotti, H. Bock, S. Fleischer;
J. Biol. Chem. 250, 5 782 - 5 790 (1975)

133. H. Anttinen;
Biochem. J. 160, 29 - 35 (1976)

134. G. von Jagow, H. Schägger, W.D. Engel, H. Hackenberg, H.J. Kolb;
in: Coll. der Ges. Biol. Chem., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1978)

135. H. Aquila, W. Eiermann, W. Babel, M. Klingenberg;
Eur. J. Biochem. 85, 549 - 560 (1978)

136. S. Yamashita, N. Nakaya, Y. Miki, S. Numa;
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 600 - 603 (1975)

137. J.C. La Rosa, R.J. Levy, R. Herbert, S.E. Lux, D.S. Fredrickson;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 57 - 62 (1970)

138. R.J. Havel, C.J. Fielding, T. Olivecrona, V.G. Shore, P.E. Fielding, T. Egelrud;
Biochem. 12, 1 828 - 1 833 (1973)

139. J.K. Huttunen, J. Ellingboe, R.C. Pittman, D. Steinberg;
Biochim. Biophys. Acta 218, 333 - 346 (1970)

140. E.J.F. Demant;
FEBS Lett. 85, 109 - 111 (1978)

141. P. Desnuelle, M. Naudet, J. Rouzier;
Compt. Rend. Soc. Biol. 141, 1 242 - 1 244 (1947)

142. P. Savary, P. Desnuelle;
Biochim. Biophys. Acta 21, 349 - 360 (1956)

143. G. Marchis-Mouren, L. Sarda, P. Desnuelle;
Arch. Biochem. Biophys. 83, 309 - 319 (1959)

144. E.D. Wills;
in: The Enzymes of Lipid Metabolism ed. P. Desnuelle, S. 13, Macmillan (Pergamon) New York (1961)

145. Biochemica Information II, S. 106, Boehringer Mannheim GmbH (1975)

146. H. Greten, R.I. Levy, H. Fales, D.S. Fredrickson;
Biochim. Biophys. Acta 210, 39 - 45 (1970)

Lebenslauf

Am 26.4.1942 wurde ich, Renate Pusch-Beier, in Schivelbein in Pommern geboren. Meine Eltern sind der pensionierte Polier Kurt Beier und seine Frau Frieda Beier, geborene Mallwitz.

1948 - 1952	Volksschule in Lippborg/Westfalen und Dortmund
1952 - 1958	Realschule in Dortmund mit dem Abschluß der mittleren Reife
1958 - 1961	Lehre mit dem Abschluß zur Chemielaborantin am MPI für Ernährungsphysiologie in Dortmund
1961 - 1963	Tätigkeit als Chemielaborantin am MPI in Dortmund
1963 - 1966	Tätigkeit als Chemielaborantin am Institut für Humangenetik der Universität Marburg. Während dieser Zeit gymnasialer Abendkurs der Volkshochschule Marburg.
1966	Abitur
1966 - 1972	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. Auswärtige Praktika während des Studiums: Naturstoffisolierungen am Physiologisch-chemischen Institut der Universität München (Prof. Klingenberg), Enzymisolierungen am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Köln (Prof. Stoffel)
1973	Diplomarbeit am MPI für Biologie, Abt. Beermann in Tübingen. Ausführung des praktischen Teils am Institut für Molekularbiologie II der Universität Zürich unter Anleitung von Professor Dr. W. Hennig. Thema: Versuche zur präparativen Anreicherung der Histon-Messenger DNS von Drosophila Melanogaster
1974	Diplomprüfung
1974 - 1978	Ausführung der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Diabetesforschung in München unter der Anleitung von Professor Dr. O.H. Wieland.

Seit 1976 bin ich mit Dipl. Ing. Dipl. Wirtsch. Ing. Günther Pusch verheiratet.